

**Charakterisierung biogener Mineralien zum Verständnis der  
Biomineralisation und Anwendung dieser Prinzipien auf die  
Kristallisation verschiedener calciumbasierter Materialien**

**Dissertation**

zur Erlangung des Grades  
„Doktor der Naturwissenschaften“  
vorgelegt von

**Fabienne Boßelmann**

geboren in Hattingen

Institut für Anorganische Chemie  
der Universität Duisburg-Essen

**2007**

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum vom 01. Mai 2004 bis zum 15. März 2007 im Arbeitskreis von Prof. Dr. Matthias Epple im Institut für Anorganische Chemie der Universität Duisburg-Essen durchgeführt.

Gutachter: Prof. Dr. M. Epple

Prof. Dr. H.-C. Flemming

Vorsitzender: Prof. Dr. E. Hasselbrink

Tag der Disputation: 25.05.2007

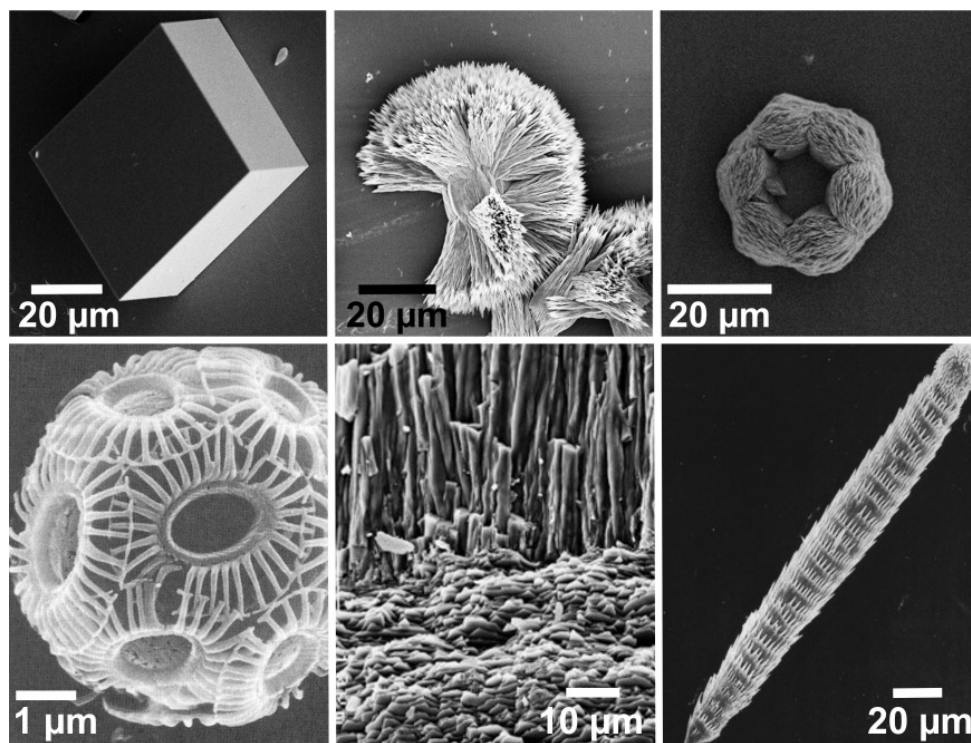
<b>1. EINLEITUNG</b>	<b>5</b>
<b>2. THEORETISCHER HINTERGRUND</b>	<b>8</b>
<b>2.1 BIOMINERALISATION</b>	<b>8</b>
<b>2.2 METHODEN ZUR NACHAHMUNG DER BIOMINERALISATION</b>	<b>14</b>
2.2.1 MISCHUNG VON ZWEI STAMMLÖSUNGEN	17
2.2.2 METHODE NACH KITANO	18
2.2.3 AMMONIUMCARBONAT-METHODE	19
2.2.4 KRISTALLISATION UNTER KONSTANTEN BEDINGUNGEN	21
2.2.5 KRISTALLISATION MITTELS DOPPELDIFFUSION	22
2.2.6 DIE <i>CONSTANT COMPOSITION DOUBLE DIFFUSION</i> (CCDD)-METHODE	24
2.2.7 KRISTALLISATION IN SYNTHETISCHEN VESIKELN	25
<b>2.3 IN DIESER ARBEIT VERWENDETE UNTERSUCHUNGSMETHODEN</b>	<b>27</b>
2.3.1 SPEKTROSKOPISCHE METHODEN	27
2.3.1.1 INFRAROTSPEKTROSKOPIE (IR)	27
2.3.1.2 KERNRESONANZSPEKTROSKOPIE (NMR)	28
2.3.2 RÖNTGENBEUGUNGSMETHODEN	28
2.3.2.1 RÖNTGENPULVERDIFFRAKTOMETRIE	29
2.3.2.2 EINKRISTALLDIFFRAKTOMETRIE	30
2.3.3 THERMOGRAVIMETRISCHE ANALYSE	30
2.3.4 ELEKTRONENMIKROSKOPIE UND ENERGIEDISPERSE RÖNTGEN- SPEKTROSKOPIE (EDX)	31
2.3.4.1 TRANSMISSIONSELEKTRONENMIKROSKOPIE (TEM)	32
2.3.4.2 RASTERELEKTRONENMIKROSKOPIE (REM) UND <i>FOCUSSED ION</i> <i>BEAM</i> (FIB)	33
2.3.5 KRITISCHE-PUNKT-TROCKNUNG ( <i>CRITICAL POINT DRYING</i> )	33
<b>3. ERGEBNISSE</b>	<b>35</b>
<b>3.1 CALCIUMCARBONAT</b>	<b>35</b>
3.1.1 CHARAKTERISIERUNG VON CRUSTACEENPANZERN	39
3.1.2 KRISTALLISATION IN GEGENWART VON BIOFILMEN UND BIOFILMBESTANDTEILEN	53

3.1.3 KRISTALLISATION MIT HILFE DER <i>CONSTANT COMPOSITION DOUBLE DIFFUSION</i> (CCDD)-METHODE	63
3.1.4 TEST DER MULTI- <i>CONSTANT COMPOSITION DOUBLE DIFFUSION</i> (CCDD)-METHODE	71
<b>3.2 CALCIUMPHOSPHATE</b>	<b>79</b>
3.2.1 NACHAHMUNG DER KRISTALLISATION IN MATERIALIEN FÜR HERZKLAPPENPROTHESEN	81
<b>3.3 CALCIUMSULFAT</b>	<b>91</b>
3.3.1 CHARAKTERISIERUNG DER RHOPALIEN VON QUALLEN	93
3.3.2 KRISTALLISATION VON CALCIUMSULFAT IN MIKROEMULSIONEN	108
<b>3.4 EISEN(II; III)-OXID</b>	<b>115</b>
3.4.1 CHARAKTERISIERUNG DER MAGNETOSOMEN VON <i>MAGNETOSPIRILLUM GRYPHISWALDENSE</i>	117
<b><u>4. ZUSAMMENFASSUNG</u></b>	<b><u>125</u></b>
<b><u>5. LITERATUR</u></b>	<b><u>129</u></b>
<b><u>6. ANHANG</u></b>	<b><u>137</u></b>
<b>6.1 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>137</b>
<b>6.2 ENTSORGUNG</b>	<b>138</b>
<b>6.3 PUBLIKATIONEN</b>	<b>139</b>
<b>6.4 LEBENSLAUF</b>	<b>140</b>
EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	141
DANKSAGUNG	142



## 1. Einleitung

Die Natur hat im Laufe der Evolution durch die Anpassung an die unterschiedlichsten Lebensbedingungen Strategien entwickelt, die optimale Eigenschaften für die jeweiligen Nischen bieten. Eine dieser Strategien ist die Abscheidung anorganischen Materials im Verbund mit organischer Materie. Die so entstehenden Biomineralien zeigen für verschiedene Anwendungsgebiete unterschiedlichste Funktionen. Ebenso vielfältig sind die verwendeten Materialien, so dass bisher über 60 verschiedene Biomineralien identifiziert werden konnten<sup>[1]</sup>. Da sie durch den Verbund von organischem und anorganischem Material hohe Härten mit hoher Flexibilität aufweisen, übernehmen sie Schutz- (Exoskelett, Schale)<sup>[2, 3]</sup>, Stütz- (Endoskelett)<sup>[4]</sup> und Werkzeugfunktionen (Zähne, Scheren)<sup>[5, 6]</sup>. Im Laufe der Entwicklungsgeschichte haben sich zudem weitere Anwendungen, wie beispielsweise in der Sinneswahrnehmung (Magnetotaxis, Schwerkraft)<sup>[7, 8]</sup> und -weiterleitung (optische Wahrnehmung)<sup>[9]</sup> ausgebildet.



**Abb. 1.1.:** REM-Aufnahmen der drei Polymorphe des Calciumcarbonats Calcit (links), Aragonit (Mitte) und Vaterit (rechts) als synthetische Kristalle (oben) und in ihrer strukturellen Formenvielfalt als Biomineral (unten). Das Exoskelett der calcitischen Coccolithen<sup>[10]</sup> (links) zeigt ebenso hochgeordnete Strukturen wie das Bruchpräparat einer aragonitischen Schneckenschale<sup>[11]</sup> (Mitte) und ein Stachel der Ascidiacea aus Vaterit<sup>[12]</sup> (rechts).

Neben den interessanten mechanischen Eigenschaften zeigen die Biomineralien gerade im Mikrometerbereich erstaunliche Strukturen, die mit großer Wahrscheinlichkeit die Stabilität des Biominerals zusätzlich erhöhen. Abbildung 1.1. zeigt die strukturelle Formenvielfalt ausgewählter Calciumcarbonatbiomineralien im Vergleich zu synthetischen Kristallen. Während die synthetischen Kristalle eindeutige, geometrische Kristallflächen ausbilden und damit das vorliegende Polymorph und das entsprechende Kristallsystem andeuten, kann aus der Struktur der Biomineralien nichts dergleichen abgeleitet werden.

Nicht nur die Funktionen, die Formenvielfalt oder die mechanischen Eigenschaften zeichnen diese Mineralien aus. Sie begegnen uns auch als Sedimentgestein (z. B. weiße Klippen in Dover, GB) oder Korallenriffe und gestalten unsere Umwelt maßgeblich mit.

Im Gegensatz zu geologischen Kristallen, die über längere Zeit unter hohem Druck und bei extremen Temperaturen entstanden sind, können die Biomineralien in relativ kurzer Zeit unter physiologischen Bedingungen in den Organismen gebildet werden. Diese besonderen Eigenschaften machen die Biomineralien für viele Wissenschaften interessant, da in der Regel optimierte Strukturen für definierte Anwendungen vorliegen, die zugleich unter Standardbedingungen gebildet wurden. Verschiedenen Fachrichtungen aus Biologie, Medizin, Chemie und Materialwissenschaft versuchen seit einigen Jahrzehnten die Grundprinzipien der Biomineralisation zu verstehen und diese mit in die Entwicklung von intelligenten Werkstoffen und Implantaten einfließen zu lassen. Zusätzlich erhofft man sich Erkenntnisse, um ungewollte Mineralisationen im menschlichen Organismus (z. B. Zahnstein, Steinbildung, Arteriosklerose) unterbinden zu können.

Die vorliegende Arbeit versucht nicht nur durch die Charakterisierung verschiedenster Biomineralien hinsichtlich ihrer Struktur und Zusammensetzung, sondern auch durch die Nachahmung der Prinzipien der Biomineralisation ein besseres Verständnis der biologischen Prozesse zu erlangen. Hierzu wurden Schalen von zwei Crustaceen hinsichtlich ihrer Bestandteile untersucht, die Schweresinnesorgane von Quallen strukturell und mineralogisch charakterisiert und die Zusammensetzung der umgebenden organischen Matrix von Magnetosomen aus magnetotaktischen Bakterien analysiert. Für die Nachahmung der Mineralisation wurden drei verschiedene Kristallisationsmethoden verwendet, die hinsichtlich ihrer Umsetzbarkeit und

---

Nähe zum biologischen System gewählt wurden. Zusätzlich wurde die von A. Becker entworfene Kristallisationsmethode<sup>[13]</sup> systematisch untersucht.

## 2. Theoretischer Hintergrund

Im folgenden Kapitel wird auf die Grundlagen der Biomineralisation eingegangen. Es schließt sich eine Betrachtung der gängigen Kristallisationsmethoden an, die zur Erforschung und Nachahmung der Biomineralisation derzeit Verwendung finden. Abschließend werden die in dieser Arbeit verwendeten Untersuchungsmethoden theoretisch umrissen und die benutzten Geräte aufgeführt.

### 2.1 Biomineralisation

Der Begriff der Biomineralisation beschreibt allgemein die biologisch induzierte Strukturierung anorganischer Materie. Dieser Begriff umfasst alle Prozesse, bei denen Mineralien durch lebende Organismen gebildet werden. Diese Einflussnahme hat zur Folge, dass das Biomineral im Gegensatz zum geologischen Kristall neben der anorganischen Komponente auch geringe Mengen organischer Substanzen enthält. Zum besseren Verständnis wurde der Begriff in die biologisch induzierte und in die biologisch kontrollierte Mineralisation unterteilt<sup>[14]</sup>. Die biologisch induzierte Mineralisation umfasst sekundäre Ablagerungen, die aus der Interaktion verschiedener Stoffwechselprozesse und der umgebenden Umwelt erwachsen. Als Beispiel seien einige Grünalgen genannt, die durch ihre photosynthetische Aktivität  $\text{CaCO}_3$  (Calciumcarbonat) abscheiden. Ebenso fällt die Akkumulation und Maskierung toxischer Metallionen wie Blei und Cadmium in den Bereich der biologisch induzierten Mineralisation und kann so eine wichtige Rolle in der Gewässerreinigung spielen. Unverkennbares Merkmal dieser Biomineralisation ist die Anlagerung des Minerals an die Zelloberfläche (epizelluläre Mineralisation). Nimmt diese Mineralisation überhand, so kann es zur Sedimentation des Organismus kommen. Zwar ist diese Mineralisation nicht unter strikter zellulärer Kontrolle, dennoch können die Zellwandkomponenten den Mineralisationsprozess beeinflussen. Diese Art der Biomineralisation ist fast ausschließlich auf das Reich der Prokaryoten begrenzt<sup>[15]</sup>.

Die biologisch kontrollierte Mineralisation bezeichnet hingegen hoch regulierte Prozesse, bei denen Biomaterialien mit spezifischer Struktur und Funktion, wie beispielsweise Knochen, Zähne und Schalen entstehen. Das präzipitierte Mineral zeichnet sich oft durch eine einheitliche Partikelgröße, definierte Strukturen und Zusammensetzungen, komplexe Morphologien, eine bevorzugte Kristallorientierung und höhere Ordnungen in hierarchischen Strukturen aus.

**Tab. 2.1.1:** Übersicht wichtiger Biomineralien und ihre Funktion<sup>[15, 16]</sup>

	Mineralname	Summenformel	Organismus	Funktion
<b>Calcium-carbonate</b>	Calcit	$\text{CaCO}_3$	Coccolithen	Exoskelett
			Foraminiferen	
			Crustaceen	
			Mollusken	Schale
			Säugetiere	Schwerkraftsensor
			Trilobiten	optische Wahrnehmung
	Mg-Calcit (Dolomit)	$(\text{Mg}, \text{Ca})\text{CO}_3$	Echinodermen	Panzer/ Stacheln
			<i>Octocorallia</i>	Stacheln
	Aragonit	$\text{CaCO}_3$	Gastropoden	Liebespfeil
			Mollusken	Schale
			Korallen	Exoskelett
			Fische	Schwerkraftsensor
			Cephalopoden	Auftrieb
	Vaterit	$\text{CaCO}_3$	Gastropoden	Schale
			<i>Ascidacea</i>	Stacheln
	amorphes $\text{CaCO}_3$	$\text{CaCO}_3 \cdot x \text{H}_2\text{O}$	Crustaceen	Exoskelett
			Pflanzen	Calciumspeicher
<b>Calcium-phosphate</b>	Hydroxylapatit	$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$	Vertebraten	Endoskelett, Zähne
	Octacalcium-phosphat	$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6$	Vertebraten	Precursor in Knochen
	amorphes Calciumphosphat	$\text{Ca}_x(\text{PO}_4)_y \cdot n \text{H}_2\text{O}$	Vertebraten	Ionenspeicher in Mitochondrien pathologische Verkalkungen
<b>Erdalkali-sulfate</b>	Bassanit	$\text{CaSO}_4 \cdot 0,5 \text{H}_2\text{O}$	Quallen	Scherkraftsensoren
	Coelestin	$\text{SrSO}_4$	<i>Acantharia</i>	Skelett
	Baryt	$\text{BaSO}_4$	<i>Loxodes</i>	Schwerkraftsensor
			<i>Caraceae</i>	
<b>Eisenoxide &amp; -hydroxide</b>	Magnetit	$\text{Fe}_3\text{O}_4$	Napfschnecken	Radula
			Käferschnecken	
			Bakterien	Magnetotaxis
			Fische & Vögel	magnetische Navigation
	Ferrihydrit	$5 \text{Fe}_2\text{O}_3 \cdot 9 \text{H}_2\text{O}$	Pflanzen / Tiere	Speicherproteine
			Biber, Ratte	Zahnoberfläche
			Seegurke	mechanische Stabilisierung
	Goethit	$\alpha\text{-FeO}(\text{OH})$	Napfschnecken	Radula
<b>Silicate</b>	amorphe Strukturen	$\text{SiO}_2 \cdot n \text{H}_2\text{O}$	Diatomeen	Exoskelett
			Radiolarien	
			Kiesel-schwämme	Lichtleitung
			Gräser	mechanische Stabilität

Diese Art der Biomineralisation findet sich in einzelligen und vor allem in mehrzelligen Eukaryonten. Einzig die gut untersuchten magnetotaktischen Bakterien<sup>[17]</sup> sind als Beispiel der kontrollierten Mineralisation im Reich der Prokaryonten bekannt<sup>[15]</sup>.

Die Aufgaben der Biomineralien sind so vielfältig wie die Substanzen, aus denen sie sich aufbauen. Bisher hat man über 60 verschiedene Biomineralien identifiziert<sup>[1]</sup>, von denen die wichtigsten in Tabelle 2.1.1 mit ihrem Vorkommen und ihrer Funktion exemplarisch zusammengefasst wurden. Es wird deutlich, dass Biomineralien neben Schutz- und Stabilitätsfunktionen wie in Schalen, Stacheln, Exo- und Endoskeletten auch für die Wahrnehmung optischer und magnetischer Reize und als Schwerkraftsensor dienen.

Untersuchungen fossiler Funde von Stromatolithen datieren diese ersten zur Biomineralisation fähigen Organismen annähernd 3,5 Milliarden Jahre zurück. Endgültig setzte sich die Biomineralisation dann vor ca. 570 Millionen Jahren durch und ist nun in fast allen Lebewesen zu beobachten<sup>[18]</sup>. Diese Zahlen verdeutlichen die Ursprünglichkeit dieser Materialien und den enormen Zeitraum der evolutionären Anpassung und Optimierung.

Bei der Betrachtung von Biomineralien und der Aufklärung ihrer Bildung spielt der Ort ihrer Entstehung eine wichtige Rolle. Die bereits bei der induzierten Mineralisation erwähnte epizellulär stattfindende Mineralisation ist auf Bereiche außerhalb des Organismus an den Zellwänden beschränkt. Interzelluläre Mineralisation findet man in Kolonien zwischen dicht gepackten Zellen, beispielsweise in Korallen. Die intrazelluläre Mineralisation ist auf Kompartimente in der Zelle beschränkt (z. B. magnetotaktische Bakterien), während bei der extrazellulären Mineralisation auf ein makromolekulares Netzwerk außerhalb der Zelle zurückgegriffen wird (z. B. Exoskelett der Crustaceen)<sup>[15]</sup>.

Für die Entstehung der Mineralien wurden die folgenden fünf grundlegende Mechanismen identifiziert, die in der Regel zusammenwirken und über genetische, bioenergetische und äußere Umwelteinflüsse reguliert werden<sup>[1]</sup>:

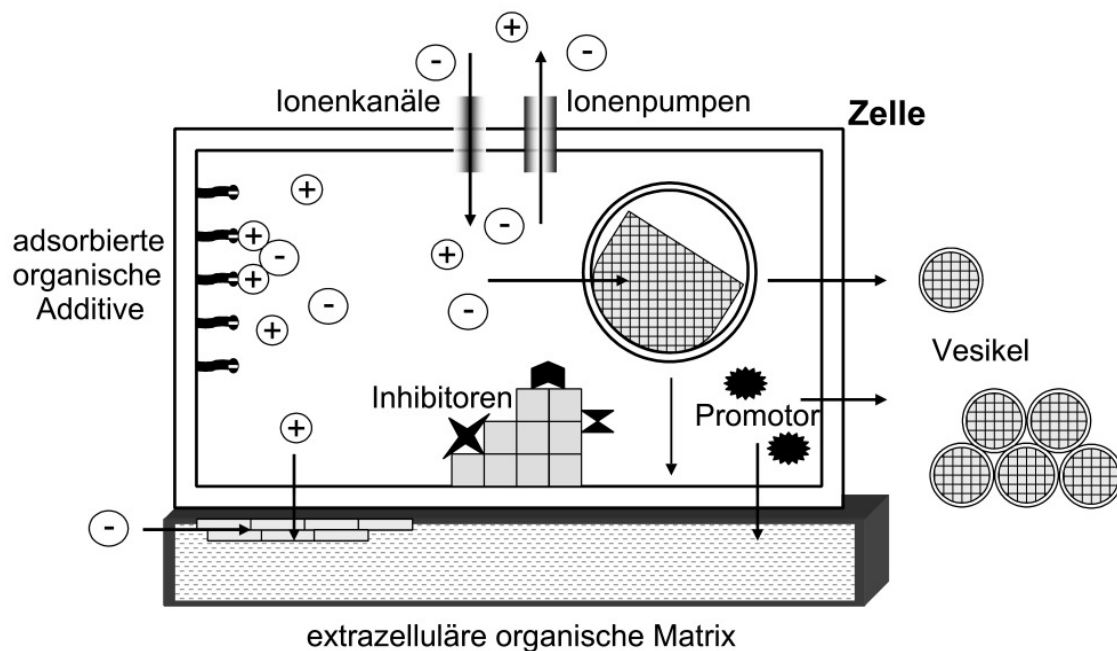
- Kontrolle der Keimbildung
- Kontrolle des Kristallwachstums und der Morphologie
- räumliche begrenzte Kristallisation in Kompartimenten
- Verbundbildung aus organischer Matrix und anorganischem Mineral
- Ausbildung hierarchisch strukturierter Aggregate

Die Keimbildung ist durch einen geregelten Ionentransport mit Überschreiten des Löslichkeitsprodukts induzierbar. Organische Moleküle dienen in dieser Phase als Keimbildner. Zugleich können sie Ionen binden und damit die Keimbildung inhibieren. Während der Keimbildung wird die polymorphe Phase des entstehenden Kristalls festgelegt. Da sich die einzelnen Polymorphe durch ihre Ionenanordnung im Kristallgitter unterscheiden, kann eine diese Unterschiede berücksichtigende, strukturierte Oberfläche das entstehende Polymorph festlegen. Während des Kristallwachstums kann über das Angebot an Ionen auf die Größe des Kristalls Einfluss genommen werden. Zusätzlich ist durch organische Moleküle, die spezifisch Kristallflächen inhibieren, ein Einfluss auf die Morphologie und Geometrie des entstehenden Minerals möglich.

Die bisher erläuterten Kontrollmechanismen können z. B. Würfel, Oktaeder oder stäbchenförmige Kristalle generieren. Geometrisch komplexere Strukturen oder definierte Partikelgrößen sind allerdings nur durch die örtlich begrenzte Kristallisation in Kompartimenten möglich. Die extrazelluläre Kristallisation in netzartigen Polymermatrices ermöglicht die Ausbildung eines Verbundwerkstoffes, dessen Polymorph anhand von adsorbierten Proteinen dirigiert werden kann (Abb. 2.1.1). Dies ist sowohl über die Mineralisation eines bestehenden polymeren Netzwerkes als auch über das Zusammenfügen organisch stabilisierter Partikel möglich. Letztere können durch die Adsorption von Additiven an der Oberfläche in ihrem Wachstum inhibiert und zu größeren Verbänden, so genannten Mesokristallen<sup>[19]</sup> zusammengefügt werden. Diese Bildungsmechanismen reichen nicht immer aus, um Materialien zu bilden, die allen Anforderungen des Organismus gerecht werden. Durch das Verbinden einzelner Kristallisationsprodukte werden hierarchische Strukturen gebildet, die den geforderten Bedingungen entsprechen. Aus einzelnen kleineren Mineralisationsprodukten kann so eine übergeordnete Struktur entstehen.

Neuere Untersuchung an Molluskenschalen konnten diese Grundprinzipien in einen logischen Zusammenhang bringen<sup>[20]</sup>. In den untersuchten Schalen konnte eine organische Matrix bestehend aus Seidenproteinen und Chitin identifiziert werden<sup>[21]</sup>. Experimente an demineralisierten Schalen zeigten, dass die Seidenproteine durch Wasseraufnahme ihr Volumen vergrößern und so in den demineralisierten Bereich hineinquellen. Daraus kann gefolgert werden, dass die Seidenproteine temporär den Raum für die spätere Präzipitation ausfüllen. Zusammen mit den Chitinfasern, die ein geordnetes Gerüst für die Strukturierung und Orientierung des Minerals vorgeben,

entsteht ein extrazellulärer Raum, der von der Umwelt isoliert wird.



**Abb. 2.1.1:** Schematische Darstellung der Grundprinzipien der Biomineralisation. Die Mineralphase (hellgrau) kann durch adsorbierte Moleküle inhibiert werden. Andere organische Moleküle wirken hingegen als Promotoren und können unter anderem adsorbiert an einer Oberfläche die Morphologie des entstehenden Kristalls vorgeben. Kanäle und Pumpen regeln die Ionenkonzentration innerhalb der Zelle oder der Vesikel. Die Kristallisation in Kompartimenten ermöglicht komplexere Geometrien, die aus der Zelle hinaus oder auch in extrazelluläre Matrices transportiert werden können.

Die Existenz von amorphem  $\text{CaCO}_3$  (ACC) in Larven<sup>[22]</sup> lässt die Vermutung zu, dass ACC eine Rolle als Precursorphase bei der Schalenbildung spielt. Hinweise darauf liefern auch neuere Untersuchungen an adulten Molluskenschalen, die an der Oberfläche eine amorphe Schicht aufzeigen<sup>[23]</sup>. Funde mineralhaltiger Vesikel, vornehmlich ACC und Vaterit in verschiedenen Geweben von Mollusken, ergänzen diese Annahme<sup>[24]</sup>. Zusammengefasst ergibt sich das Bild, dass die gelartige Matrix den Bereich der Mineralisation klar von der Umwelt abgrenzt. In einem weiteren Schritt werden mineralhaltige Vesikel in die Matrix transportiert. Dort immobilisierte, saure Proteine dirigieren die Morphologie der sich aus ACC bildenden Kristallphase während die Chitinfasern dem ganzen System eine geordnete Struktur geben. Bei der Kristallisation werden die sauren Proteine zum Teil in die Kristalle eingeschlossen. Diese Annahmen geben einen ersten tiefergehenden Einblick in die Komplexität und den ungefähren Ablauf der Biomineralisation. Dennoch bleiben viele Fragen offen.



Die genaue Charakterisierung der Biomineralien und die Untersuchung der auf die Entstehung einflussnehmenden Substanzen sollen die Mechanismen der Biomineralisation aufklären. Nur so ist man in der Lage die Prinzipien auf materialwissenschaftliche Fragestellungen anzuwenden und sie einer Nutzung zugänglich zu machen<sup>[25]</sup>.

## 2.2 Methoden zur Nachahmung der Biomineralisation

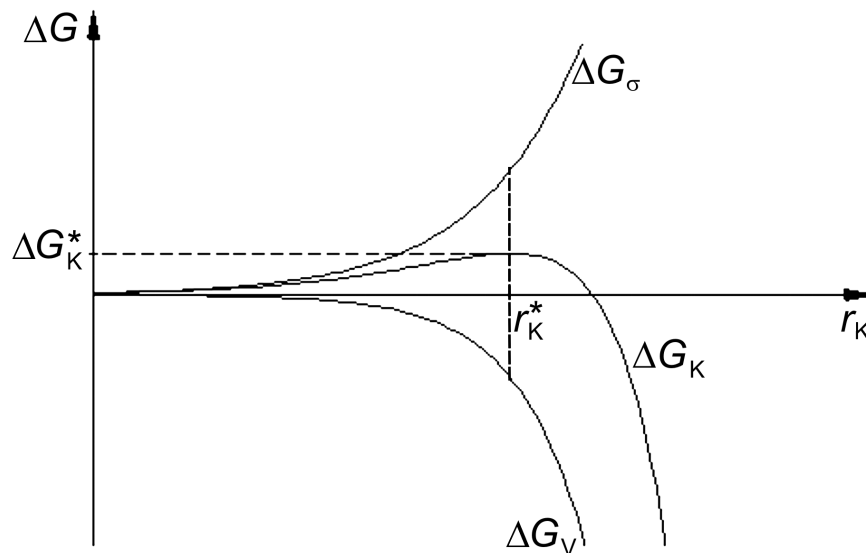
Die Untersuchung der Biomineralisation schließt neben der Charakterisierung der Materialien auch die Nachahmung der angenommenen Prinzipien mit ein. Grundlegend für diese Arbeiten ist das Wissen über die allgemeine Kristallisation anorganischer Materie. Nachdem man schon früh erkannt hatte, dass Faktoren, wie z. B. die Temperatur einen Einfluss auf die sich ausbildende Phase einer Verbindung hatte, wurden im Laufe der Zeit die zwei Modellmechanismen der Keimbildung und des Kristallwachstums entwickelt, die die Kristallisationsprozesse beschreiben.

Die Kristallkeimbildung beschreibt die Entstehung eines aus wenigen Formeleinheiten zusammengesetzten Kristalliten. Sie wird in die homogen und die heterogene Keimbildung unterteilt. Unter thermodynamischen Gesichtspunkten ist die Keimbildung bei gegebenen Druck und gegebener Temperatur dann ein spontan ablaufender Prozess, wenn die freie Enthalpie  $G$  des Systems abnimmt. Die Änderung der freien Enthalpie  $\Delta G_K$  setzt sich aus einem Volumenbeitrag  $\Delta G_V$  und einer Grenzflächenenergie  $\Delta G_\sigma$  zusammen:

$$\Delta G_K = \Delta G_V + \Delta G_\sigma \quad (\text{Gl. 2.1})$$

Während der Volumenbeitrag  $\Delta G_V$  aus dem Übergang der übersättigten Phase in die Kristallphase resultiert und proportional zum Volumen des Kristalls ist, beschreibt der Oberflächenbeitrag  $\Delta G_\sigma$  die durch den Keim entstandene Ausbildung einer neuen Phasengrenze, die sich proportional zur Oberfläche des Keims verhält.

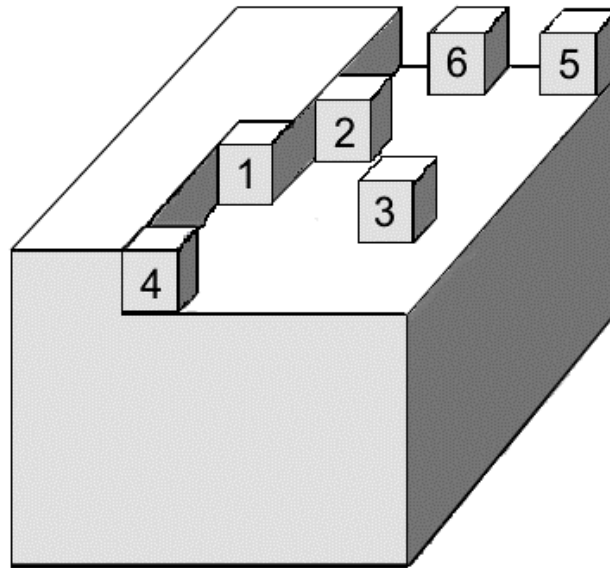
Wird die Änderung der freien Enthalpie bei der Keimbildung als Funktion des Keimradius  $r_K$  betrachtet (Abb. 2.2.1), so durchläuft diese beim kritischen Keimradius  $r_K^*$  ein Maximum. Erst wenn ein Keim diese kritische Größe erreicht hat, kann ein Kristallwachstum einsetzen, durch das sich die freie Enthalpie des Systems wieder verringert. Unterhalb dieser kritischen Größe lösen sich die Keime wieder auf.



**Abb. 2.2.1:** Änderung der freien Enthalpie  $\Delta G_K$  bei der Bildung eines Keimes mit einem kritischen Keimradius  $r_K^*$  als Funktion des Keimradius  $r_K$  in Abhängigkeit zum Oberflächenbeitrag  $\Delta G_\sigma$ , zum Volumenbeitrag  $\Delta G_V$  und zur Keimbildungsarbeit  $\Delta G_K^*$  [26].

Im Gegensatz zur spontan einsetzenden, homogenen Keimbildung tritt die heterogene Keimbildung an Gefäßwänden und Fremdpartikeln ein, an denen die Oberflächenenergie herabsetzt und damit der Oberflächenbeitrag  $\Delta G_\sigma$  erniedrigt wird. Die heterogene Keimbildung läuft demzufolge leichter ab.

Wurde der kritische Keimradius überschritten, so setzt das Kristallwachstum ein, das durch die Adsorption von Ionen auf der Kristalloberfläche charakterisiert ist. Die adsorbierten Ionen bewegen sich mittels Diffusion und Konvektion über die Oberfläche des Kristalls bis sie sich entweder wieder lösen oder an eine energetisch günstige Position der entstehenden Kristallschicht gelangen (Abb. 2.2.2). Eine bevorzugte Anlagerung ist an den Stellen zu erwarten, die den größtmöglichen Energiegewinn mit sich bringen. Dieser Energiegewinn hängt von den benachbarten Ecken und Kanten der entstehenden Schicht ab. Je höher diese Anzahl ist, desto höher ist die Anlagerungsenergie. An der Stelle mit der höchsten, relativen Anlagerungsenergie (Abb. 2.2.2 Position 1) ist die größte Wahrscheinlichkeit gegeben, dass das Ion seine Hydrathülle abgibt und sich in das Kristallgitter einbaut. Diese Position wird als Halbkristalllage bezeichnet. Das Wachstum erfolgt reihen- und schichtweise und führt in perfekten Kristallen ohne Gitterbaufehler zu atomar glatten Kristallflächen.



**Abb. 2.2.2:** Anlagerungsmöglichkeiten von Gitterbausteinen (Ionen) auf einer Kristalloberfläche nach dem Modell von Kossel und Stranski<sup>[26]</sup>. Position 1 weist aufgrund der dort zu Verfügung stehenden Bindungen an drei Flächen und neun Kanten die höchste Anlagerungsenergie auf während an Position 3 mit nur einer Fläche und 4 Kanten die niedrigste Anlagerungsenergie zu erwarten ist.

Berücksichtigt man die Grundlagen der Kristallisation, so kommt bei der Untersuchung von Biomineralien hinzu, dass Additive in den Kristallisationsprozess mit eingreifen. Ihr Einfluss auf die Ausbildung von Kristallen ist mannigfaltig. Adsorbieren sie an Kristalloberflächen, so können sie die Morphologie des Kristalls verändern oder das Wachstum inhibieren. Weiter ist es möglich, dass sie als Nukleationskeim fungieren und die Kristallisation fördern. Überdies kann es zum Einbau der Additive in das Kristallgitter kommen. Dadurch entsteht ein Stoff mit anderen Eigenschaften. Allgemein können drei verschiedene Klassen von Additiven unterschieden werden, deren Zugabe sich auf das Kristallwachstum auswirkt:

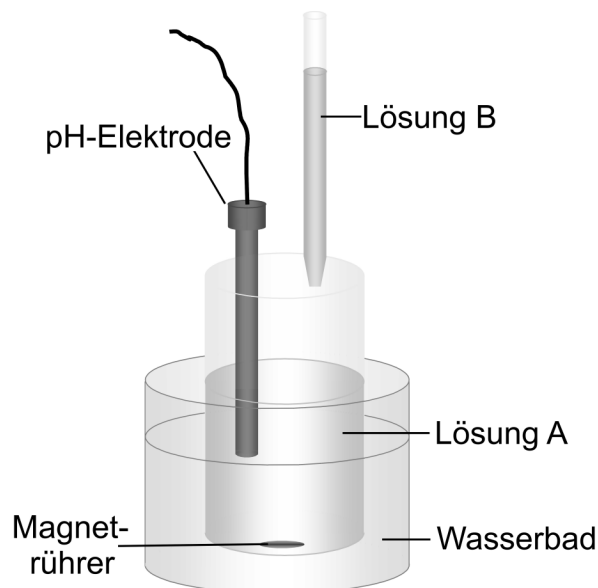
- Säuren und Basen: der pH-Wert nimmt Einfluss auf das Ionenverhältnis (z. B.  $\text{CO}_3^{2-}$  zu  $\text{HCO}_3^-$ ) in der Kristallisationslösung und kann das Wachstum fördern oder zur Auflösung des Kristalls beitragen.
- anorganische Additive: geringe Konzentrationen anorganischer Ionen wie  $\text{Mg}^{2+}$  können die Größe, Form und das Polymorph des entstehenden Kristalls dirigieren. Durch den Einbau ins Kristallgitter entstehen neue Eigenschaften.

- organische Additive: sie beeinflussen schon in geringen Konzentrationen durch spezifische und unspezifische Adsorption das Kristallwachstum und die Morphologie. Durch das Binden kristallisationsrelevanter Ionen können sie zudem die Ionenkonzentration beeinflussen (z. B. Calciumbindung im Blut).

Für die Untersuchung der Additive und ihrer Auswirkungen auf die Kristallisation sind im Laufe der Zeit verschiedenste Kristallisationsmethoden entwickelt worden. Im Folgenden soll auf prominente Methoden in der Erforschung der Biomineralisation eingegangen und ihr Nutzen kritisch betrachtet werden.

### 2.2.1 Mischung von zwei Stammlösungen

Die einfachste Möglichkeit der Kristallisation ist das Zusammenfügen zweier Lösungen in einem Reaktionsgefäß mit Additivzugabe. Normalerweise wird hierbei eine der beiden Lösungen mit den Additiven im Reaktor vorgelegt und die zweite Lösung zusammen mit Additiven zugetropft (Abb. 2.2.3).



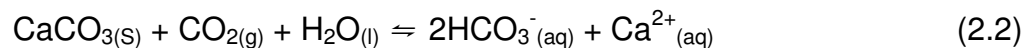
**Abb. 2.2.3:** Schematische Darstellung der Kristallisationsmethode. Zur im Gefäß befindlichen Lösung A wird die zweite Lösung B unter ständigem Rühren zugetropft. Bei der Vereinigung der beiden Lösungen spielen sowohl die Zutropfgeschwindigkeit als auch die Reihenfolge, welche der beiden Lösungen vorgelegt wird, eine Rolle für die sich bildende Mineralphase.

Das ganze System ist thermostatisierbar und der Reaktionsverlauf kann anhand der Messung des pH-Werts verfolgt werden<sup>[27]</sup>. Die Geschwindigkeit der Vereinigung beider Lösungen spielt bei der Kristallisation ebenso eine Rolle wie die Reihenfolge, welche Lösung zu welcher getropft wird. Am Beispiel des Calciumcarbonats konnte bereits ohne Additivzugabe beobachtet werden, dass dies einen entscheidenden Einfluss auf die entstehenden Polymorphe ausübt<sup>[28]</sup>.

Diese Methode hat keinen Bezug zu den im Organismus ablaufenden Reaktionen. Sie eignet sich aber dennoch, um den generellen Einfluss der Additive auf die Nukleation und das Kristallwachstum abzuschätzen, benötigt aber hohe Additivkonzentrationen<sup>[29]</sup>.

### 2.2.2 Methode nach Kitano<sup>[30]</sup>

Einen ähnlich einfachen Aufbau findet man bei der von Y. Kitano entwickelten Methode. Hier wird eine gesättigte  $\text{CaCO}_3$ -Lösung vorgelegt und diese durch Begasung mit  $\text{CO}_2$  in eine übersättigte Lösung überführt (Gl. 2.2).



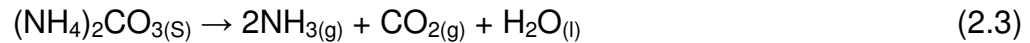
Vor Verwendung für die Kristallisationsversuche wird die Lösung kurz abfiltriert, um etwaige Nukleationskeime zu entfernen. Nach abschließender erneuter  $\text{CO}_2$ -Begasung kann dann mit der Zugabe der Additive die Kristallisation beginnen. In der Lösung bildet sich mit der Zeit ein Diffusionsgradient aus. Die höchste Übersättigung an  $\text{CaCO}_3$  kann an der Grenzfläche der Lösung zur Luft gemessen werden. Zwar ist durch diese unbestimmten Experimentierbedingungen nicht voraussagbar, bei welcher Übersättigung die Kristallisation einsetzt. Dennoch ist gerade die mit der Zeit zunehmende Übersättigung sehr vorteilhaft für Kristallisationsexperimente.

Dass die höchste Übersättigung an der Grenzfläche zur Luft zu finden ist, lässt den Rückschluss zu, dass die Gefäßwände nur geringfügig zur Kristallisation beitragen. Eine kurze Versuchsdauer von wenigen Stunden bis zu einem Tag spricht für diese Methode. Zudem eignet sie sich gut für Experimente an selbst organisierenden Monolagen (*self assembled monolayers*)<sup>[31, 32]</sup>.

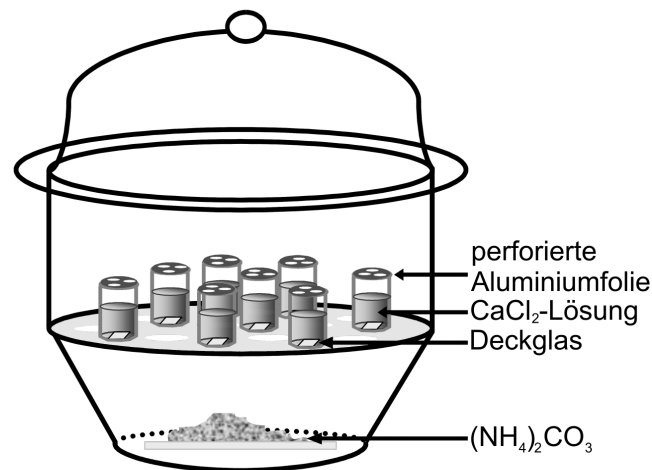
Allerdings sind die experimentellen Bedingungen dieser Methode nur zu Beginn des Versuchs genau definiert. Die Bedingungen, bei denen sich die Kristalle ausbilden, sind unbekannt und können nicht weiter beeinflusst und reguliert werden. Entsprechend weit entfernt ist diese Methode von der biologisch kontrollierten Mineralisation.

### 2.2.3 Ammoniumcarbonat-Methode<sup>[33]</sup>

Grundlage dieser Methode ist die langsame Diffusion von  $\text{CO}_2$  in eine Lösung mit Calciumionen. Da Ammoniumcarbonat  $((\text{NH}_4)_2\text{CO}_3)$  bei  $20\text{ }^\circ\text{C}$  einen Dampfdruck von 69 hPa hat, zersetzt es sich langsam nach Gleichung 2.3 und wird deshalb als  $\text{CO}_2$ -Quelle eingesetzt.

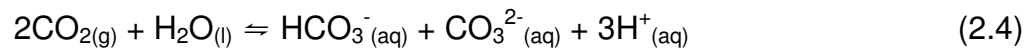


Der Versuchsaufbau ist in Abbildung 2.2.4 schematisch dargestellt. Um die Diffusionsgeschwindigkeit weiter herab zu setzen, werden die Calciumlösungen mit einer perforierten Aluminiumfolie abgedeckt. Dadurch wird die Diffusion verlangsamt und die Kristallisationsgeschwindigkeit verringert. Somit nähert sich dieser Versuchsaufbau dem natürlichen System.



**Abb. 2.2.4:** Die Graphik zeigt schematisch den Versuchsaufbau der Ammoniumcarbonat-Methode. Die in einem Exsikkator positionierten Calciumlösungen werden mit perforierter Aluminiumfolie abgedeckt. Das sich langsam zersetzende  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$  gibt mit der Zeit  $\text{CO}_2$  an die Luft ab. Die in den Calciumlösungen entstehenden Kristalle fallen auf die Deckgläschen und können anschließend für die weitere Charakterisierung entnommen werden.

Messungen zeigen zu Beginn der Reaktion einen Abfall des pH-Werts von 7,0 auf 5,5. Nach ca. 30 Minuten steigt dieser auf einen Wert von etwa 9,8 an, um sich dann bei 9,3-9,5 einzupendeln<sup>[34]</sup>. Das freiwerdende  $\text{CO}_2$  geht zu Beginn im Wasser in Lösung (Gl. 2.4).

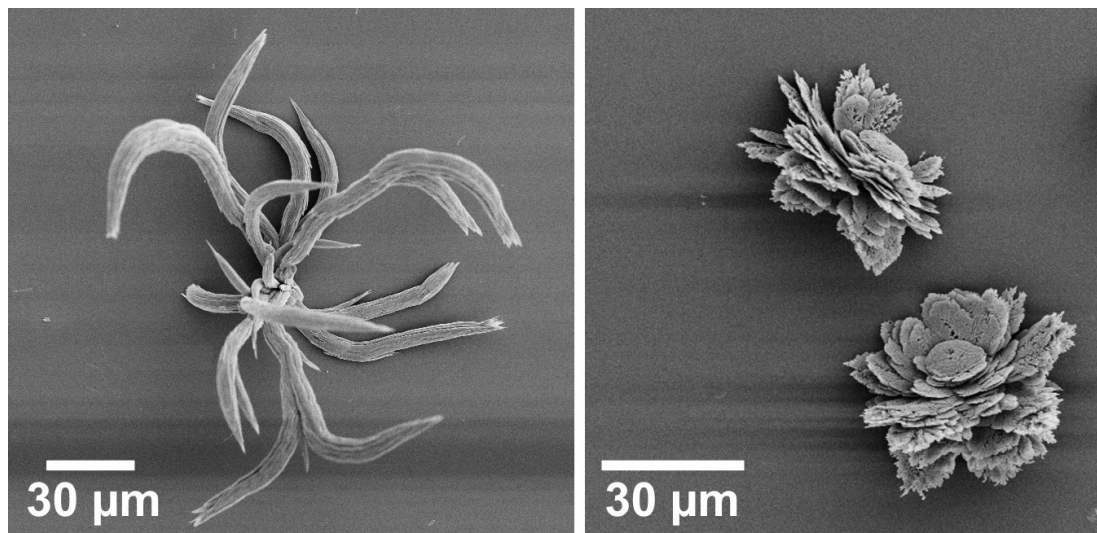


Der daraus resultierende Abfall des pH-Werts wird durch nachdiffundierendes  $\text{NH}_3$  aufgefangen und ausgeglichen (Gl. 2.5).



Die anschließend beobachtete pH-Wert-Erniedrigung ist auf die Kristallisation von  $\text{CaCO}_3$  zurückzuführen. Problematisch an dieser Situation ist die Tatsache, dass die Schwankungen des pH-Werts einen Einfluss auf die in der Lösung befindlichen Additive haben können.

Bei dieser Methode ist zu berücksichtigen, dass einige Proteine bereits während der ersten halben Stunde denaturieren können und somit nicht mehr ihre ursprüngliche Gestalt und Funktion aufweisen. Negativ wirkt sich überdies aus, dass die Ammoniumionen in das Kristallgitter von  $\text{CaCO}_3$  eingebaut werden können und so auf die Morphologie des entstehenden Kristalls Einfluss nehmen (Abb. 2.2.5).



**Abb. 2.2.5:** REM-Aufnahme von Aragonit- (links) und Vateritkristallen (rechts), die ohne Additivzugabe in der Ammoniumcarbonat-Methode bei 30 °C kristallisiert wurden. Während die strahlenförmigen Aragonitnadeln sich durch den Einbau von Ammoniumionen krümmen, werden die an der Oberfläche der Vateritkristalle sitzenden Ammoniumionen während des Abspülens mit Ethanol aufgrund ihrer höheren Löslichkeit ausgewaschen und hinterlassen löchrige Strukturen.



Oberflächlich eingebaute Ammoniumionen werden beim Abspülen der Proben mit Ethanol herausgewaschen und hinterlassen poröse Strukturen (Abb. 2.2.5 rechts). In Aragonitnadeln mit eingebaute Ionen sorgen hingegen für einen gekrümmten Wuchs (Abb. 2.2.5 links).

Überdies konnte J. I. Arias *et al.*<sup>[35]</sup> zeigen, dass kleine Veränderungen an den Gefäßgrößen, -öffnungen oder den Füllhöhen der Lösungen zu Veränderungen der Reaktionskinetik führen, die sich direkt auf das sich bildende Polymorph auswirken. Da in den bisherigen Arbeiten keine Angaben über die genauen Abmessungen gemacht wurden, ist der beobachtete Einfluss der Additive verschiedener Arbeitsgruppen nicht uneingeschränkt miteinander vergleichbar.

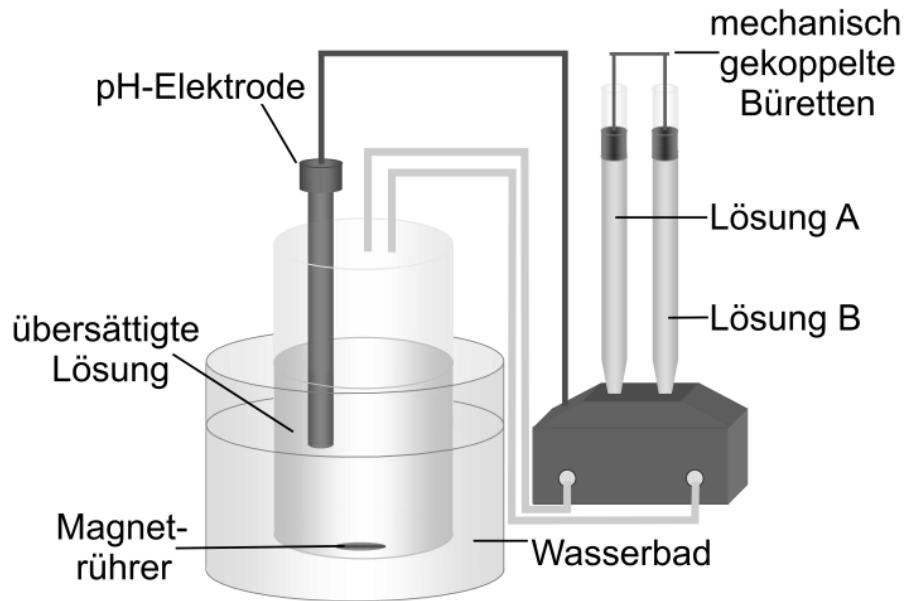
Dennoch handelt es sich bei der vorliegenden Methode um ein System, das sich durch die langsame Diffusionsgeschwindigkeit dem natürlichen System annähert. Ferner ermöglichen Reaktionszeiten von maximal 24 Stunden einen schnellen Überblick über die verwendeten Additive. Zu beachten bleibt, dass einige Additive in dieser Methode keinen Einfluss auf die Morphologie ausüben, in anderen Methoden dieser Einfluss aber deutlich nachweisbar ist<sup>[34]</sup>.

#### **2.2.4 Kristallisation unter konstanten Bedingungen<sup>[36]</sup>**

Ein konstanter, kontrollierter pH-Wert ist eine dem Organismus innewohnende Eigenschaft. In der beschriebenen Methode wird über die Messung des pH-Wertes versucht, die Ionenkonzentrationen konstant zu halten und so das biologische System zu imitieren. Grundlage ist der bei der Kristallisation von Calciumcarbonaten oder Calciumphosphaten sinkende pH-Wert. Durch Zugabe einer Stammlösung können der pH-Wert ausgeglichen und die Ionenkonzentration konstant gehalten werden. Der in Abbildung 2.2.6 dargestellte experimentelle Aufbau zeigt ein Reaktionsgefäß mit übersättigter Kristallisationslösung.

Die Reaktion wird mit der Zugabe von Impfkristallen gestartet. Fällt der pH-Wert während der Kristallisation unter einen bestimmten Schwellenwert, wird Stammlösung in das Reaktionsgefäß gegeben. Zahlreiche Versuche haben die Funktionalität und die Reproduzierbarkeit des Systems bestätigt<sup>[37, 38]</sup>. Eine zusätzlich angebrachte calciumselektive Elektrode verbessert den Regelungsprozess entscheidend<sup>[39]</sup>. Dennoch ist dieses von G. H. Nancollas entwickelte System nur bedingt mit biologischen Vorgängen vergleichbar, da die Kristallisation sehr schnell vonstatten geht. Unter anderem werden hohe Additivkonzentrationen<sup>[40]</sup> eingesetzt, die den biologischen Gegeben-

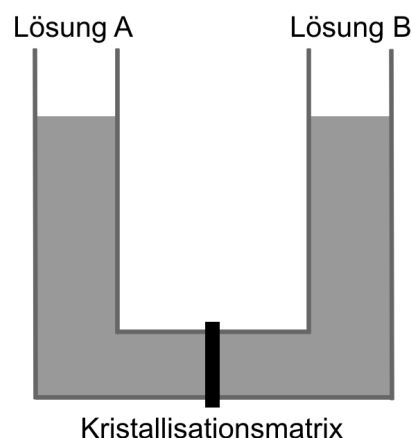
heiten widersprechen.



**Abb. 2.2.6:** Schematische Darstellung der *constant composition*-Anlage. Über die Messung des pH-Wertes wird die Konzentration der Lösungen konstant gehalten.

### 2.2.5 Kristallisation mittels Doppeldiffusion

Eine langsame Diffusion und die daraus resultierende langsame Mineralisation spiegeln grundlegende Gegebenheiten der Biomineralisation wieder. Dieses Prinzip wird mit der Kristallisation in einem U-Rohr aufgegriffen, in das eine Kristallisationsmatrix eingebracht wird (Abb. 2.2.7)<sup>[41]</sup>.



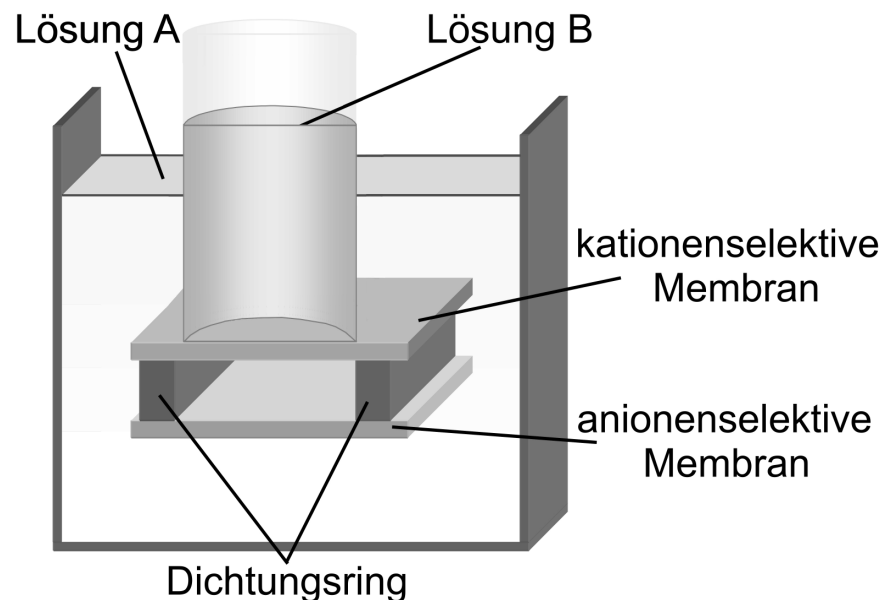
**Abb. 2.2.7:** Darstellung der auf der Diffusion in eine Kristallisationsmatrix beruhenden Mineralisation.

Als Kristallisationsmatrix können Gele<sup>[42, 43]</sup> oder beliebig poröse Materialien, wie Polycarbonatfilter<sup>[44]</sup> dienen, die zusätzlich funktionalisiert werden können. Die Ionen diffundieren von beiden Seiten in die Matrix und kristallisieren vor Ort aus.

Die Hohlräume der Matrix können so mit Mineral ausgefüllt werden. Versuche mit Calcium- und Phosphatlösungen und einer Matrix aus Chitosan ermöglichten die Herstellung von Apatitstrukturen, die denen des Knochenbaus stark ähneln und als Knochenersatzmaterial Verwendung finden könnten<sup>[45]</sup>.

Problematisch an dieser Methode ist, dass keine Ionen nachgeliefert werden und der pH-Wert als auch die Ionenkonzentration sinken. Zugleich ist die Menge an Additiven immens, wenn diese nicht in der Kristallisationsmatrix immobilisiert, sondern frei in die Lösungen geben werden.

Die Verwendung großer Mengen Additiv kann mit einer Erweiterung der Methode umgangen werden, die in Abbildung 2.2.8 dargestellt ist

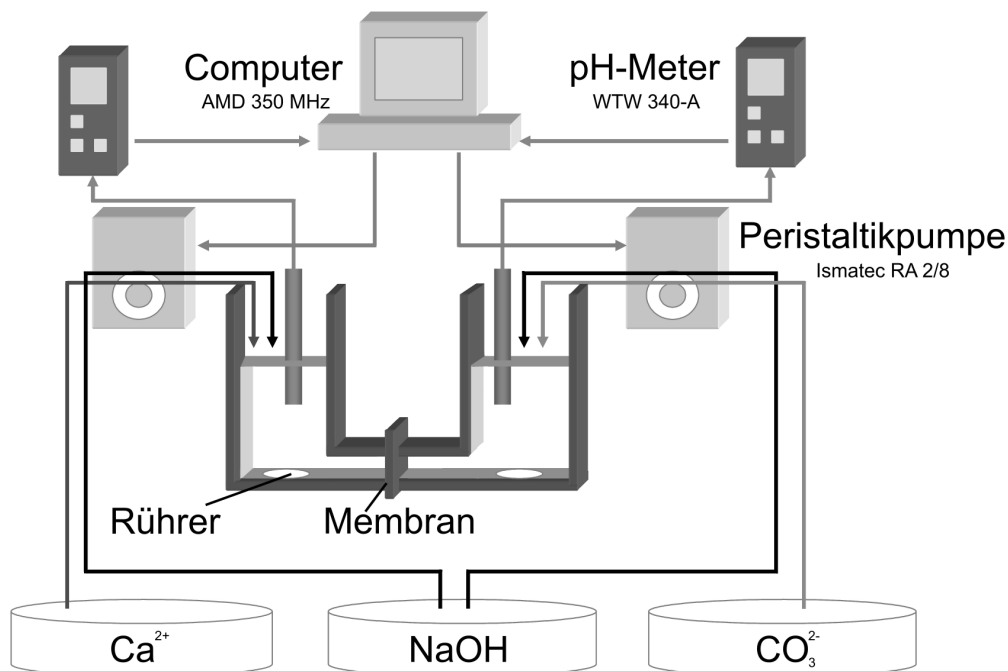


**Abb. 2.2.8:** Schematische Darstellung der Doppeldiffusionsmethode mit der Verwendung eines Kristallisationskompartiments. Das Kompartiment und das Gefäß von Lösung B sind in der Schnittansicht gezeigt.

Durch die Verwendung von zwei Membranen wird ein Kompartiment aufgebaut, das mit kleinen Mengen Additiv auskommt<sup>[46]</sup>. Für die Untersuchung des Additiveinflusses reichen diese Maßstäbe aus. Die Herstellung größerer, intelligenter Werkstoffe ist hingegen so nicht umsetzbar. Der Einfluss der verwendeten Kristallisationsmatrix ist ebenso zu berücksichtigen.

### 2.2.6 Die *Constant composition double diffusion (CCDD)*-Methode

F. Peters und M. Eppler kombinierten die Doppeldiffusion mit konstanten Versuchsbedingungen für die Kristallisation von Fluorapatit<sup>[47]</sup>. Zwei Reaktionsgefäße sind in diesem System über eine Kristallisationsmembran miteinander verbunden. Um eine Kontrolle des pH-Wertes zu gewährleisten, sind beide Reaktionsgefäße mit einem pH-Meter versehen, das den pH-Wert detektiert (Abb. 2.2.9).



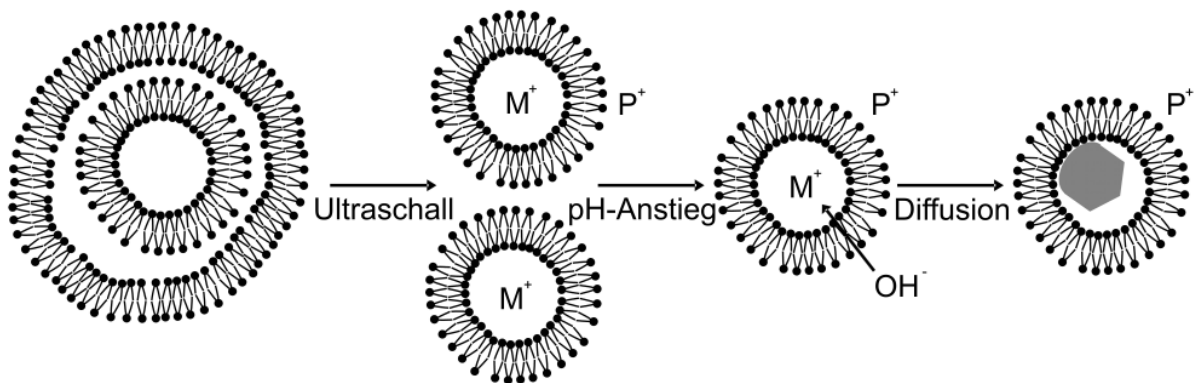
**Abb. 2.2.9:** Schematische Darstellung der CCDD-Anlage. Zwei Reaktorgefäße sind über eine Kristallisationsmembran miteinander verbunden. Der pH-Wert wird in jedem Reaktionsgefäß gemessen und durch die Zugabe von NaOH-Lösung konstant gehalten. Zeitgleich zugepumpte Stammlösung gleicht den Ionenverlust aus.

Fällt der pH-Wert unter einen gesetzten Schwellenwert, so wird die zugehörige Stammlösung zusammen mit einer Base zugepumpt. Die Zusammensetzung der Lösungen in den beiden durch eine Membran getrennten Reaktionsräume werden demnach separat konstant gehalten und der durch die Kristallisation hervorgerufene Ionenverlust ausgeglichen. Das System  $\text{CaCO}_3$  konnte ebenso auf diese Methode übertragen werden<sup>[34]</sup>. Versuche mit aus Mollusken stammenden, demineralisierten organischen Matrices ermöglichten eine vollständige Remineralisation in der CCDD-Anlage<sup>[48]</sup>. Die auch in dieser Arbeit Verwendung findende Methode imitiert die

biologischen Zustände wie keine andere. Allerdings ist die Umsetzung technisch komplex und zeitaufwändiger als in anderen Versuchsaufbauten.

### 2.2.7 Kristallisation in synthetischen Vesikeln

Die beschriebenen Methoden versuchen primär die Kristallisation unter Additiveinfluss oder in extrazellulären Matrices nachzustellen. Auch wenn teilweise mit definierten Reaktionsräumen gearbeitet wird, bleibt die Untersuchung der Kristallisation in kleinen Kompartimenten unberücksichtigt. Die Nachahmung dieses Grundprinzips der Biomineralisation kann mit Hilfe von synthetischen Vesikeln bewerkstelligt werden. Ein einfaches System ist die Verwendung von amphiphilen Substanzen in wässriger Lösung (z. B. Phosphatidylcholin). Die sich ausbildenden doppelschichtigen, mehrschaligen Aggregate können mittels Ultraschall in gleichgroße Vesikel zerteilt werden. In den Vesikeln sind Metallkationen eingeschlossen. In der Lösung befindliche  $\text{OH}^-$ -Ionen diffundieren in die Vesikel hinein und reagieren dort mit den Metallkationen (Abb. 2.2.10).



**Abb. 2.2.10:** Schematische Darstellung von mehrschaligen Lipidaggregaten, die mittels Ultraschall in gleich große Vesikel geteilt werden. Die in die Vesikel eingeschlossenen Metallionen ( $\text{M}^+$ ) reagieren mit den durch die Membran diffundierenden  $\text{OH}^-$ -Ionen. Inerte Kationen ( $\text{P}^+$ ) sind für die Elektroneutralität des Systems notwendig.

Bedingt durch die maximale Anzahl an einzuschließenden Kationen und der daraus resultierenden Größe und Form der Vesikel entstehen runde Partikel mit Durchmessern unter 20 nm. Mehrschalige Vesikel können zudem zur Kristallisation von organisierten Nanostrukturen herangezogen werden<sup>[49]</sup>. Bedingt durch die umgebende Lipiddoppelschicht bleiben die Partikel stabil und agglomerieren nicht zu größeren Aggregaten. Die Geschwindigkeit der Reaktion hängt von der Diffusions-

geschwindigkeit der beteiligten Ionen durch die Lipiddoppelschicht ab.

Eine andere Möglichkeit, die Mineralisation in definiert kleinen Reaktionsräumen ablaufen zu lassen, ist die Kristallisation in Mikroemulsionen. Dabei handelt es sich um ein Gemisch aus Wasser, Öl und Tensid. Anstelle einer Lipiddoppelschicht bilden sich Mizellen aus, die vom Tensid begrenzt werden. Die Kristallisation innerhalb der Mizellen wird über die kurzzeitige Ausbildung von Dimeren und dem so möglichen Austausch der Mizellbestandteile ermöglicht. Auf die Theorie wird näher in Kapitel 3.3.2 eingegangen. Die Mizellen können sich zu größeren Agglomeraten zusammenlagern und geordnete Strukturen aufbauen<sup>[50-52]</sup>.

Nachteil dieser beiden Methoden ist, dass kein Einfluss auf die Ionenkonzentration oder den pH-Wert in den Kompartimenten genommen werden kann. Dennoch bietet diese Methode eine Möglichkeit, definierte Partikelgrößen herzustellen.

Jede der in diesem Kapitel vorgestellten Methoden weist ihre Vor- und Nachteile auf. Während die Methoden 2.2.1 - 4 sowohl die Kristallisation in Lösung als auch an Oberflächen ermöglichen, beschränken sich die anderen Methoden auf das an Oberflächen stattfindende Kristallwachstum. Die Kristallisation in synthetischen Vesikeln (Kapitel 2.2.7) greift das Prinzip der Mineralisation in Kompartimenten auf. Dennoch ist sie kaum zu regulieren und kann so nur Teilaspekte der Biomineralisation nachempfinden. Welche Methode für die eigenen Experimente gewählt wird, hängt von der Fragestellung und der Umsetzbarkeit der einzelnen Versuche ab. Hoch regulierte Systeme beanspruchen einen größeren experimentellen und zeitlichen Aufwand, der in Relation zur Fragestellung gesetzt werden muss. Zu beachten ist immer, dass Ergebnisse aus einer Methode nicht mit denen einer anderen verglichen werden können, da jede Methode andere kinetische Bedingungen aufweist, die sich zusätzlich auf die Mineralisation auswirken. Entsprechend sinnvoll ist die Untersuchung des Additiveinflusses in verschiedenen Methoden, um ein ganzheitliches Bild zu erlangen. Die Aufklärung der biologisch ablaufenden Prozesse sollte möglichst mit Methoden untersucht werden, die den Prinzipien der Biomineralisation besonders nahe kommen. Dies ist unter anderem mit der Kristallisation in Kompartimenten und unter konstanten Bedingungen realisierbar.

## 2.3 In dieser Arbeit verwendete Untersuchungsmethoden

Im Folgenden werden die in dieser Arbeit verwendeten Methoden kurz theoretisch umrissen und die zur Verfügung stehenden Geräte aufgeführt.

### 2.3.1 Spektroskopische Methoden<sup>[53]</sup>

Spektroskopische Methoden dienen unter anderem der Identifizierung molekularer Strukturen. Sie beruhen auf der energieaufgelösten Wechselwirkung elektromagnetischer Strahlung mit Materie. Diese Wechselwirkung lässt sich als Abhängigkeit der Strahlungsfrequenz  $\nu$  von der Energie  $E$  des Photons wie folgt beschreiben, wobei  $h$  das Plancksche Wirkungsquantum ( $6,626 \cdot 10^{-34}$  J s) bezeichnet.

$$E = h \cdot \nu \quad (2.6)$$

In dieser Arbeit werden Absorptions-, Emmissions- und Beugungsmethoden angewendet

#### 2.3.1.1 Infrarotspektroskopie (IR)

Die Infrarotspektroskopie gehört zu den Absorptionsmethoden. In der Regel wird mit Strahlung im Wellenlängenbereich von 1 bis 50  $\mu\text{m}$  des elektromagnetischen Spektrums gearbeitet. Beim Durchstrahlen einer Substanz erhält man Absorptionsbanden, die bindungsspezifische Schwingungsänderungen der Substanzen repräsentieren. Man unterscheidet unter anderem Valenz- (Änderung des Atomabstands) und Deformationsschwingungen (Änderung des Valenzwinkels, gleich bleibender Atomabstand). Für die Infrarotaktivität sind ein bereits vorhandener Dipol im Molekül (z. B. polare Moleküle, wie  $\text{CO}_2$ ) oder eine Änderung des Dipolmoments während des Schwingungsvorgangs notwendig. Die Anzahl der möglichen Schwingungsfreiheitsgrade  $N$ -atomiger Moleküle beträgt  $3N-6$ , bei linearen Molekülen  $3N-5$ .

Die Energieabsorption hängt von der jeweiligen Bindung und den an der Bindung beteiligten Atomen ab. In Tabellenwerken<sup>[54]</sup> sind die Schwingungen von vielen Atomgruppen (z. B. Amine, Alkohole) zusammengefasst, die zum Vergleich und zur Identifizierung unbekannter Substanzen genutzt werden können.

Für die in der Arbeit notwendigen Messungen wurde ein IR-Spektrometer Vertex 70 der Firma Bruker benutzt, mit dem auch über eine TGA-IR-Kopplung die Gase der TGA-Messungen (s. u.) untersucht wurden.

### 2.3.1.2 Kernresonanzspektroskopie (NMR)

Die NMR-Spektroskopie beruht auf der Wechselwirkung elektromagnetischer Strahlung im Radiowellenbereich mit Atomkernen der zu untersuchenden Substanz in einem sehr starken homogenen Magnetfeld. Sie dient der Bestimmung von Anzahl, Lage und Bindungsart der im Molekül gebundenen Kerne. Grundlegend dafür ist die Orientierung der Atomkerne mit ihrem Kernspin im umgebenden Magnetfeld. Diese Orientierung ist nur in bestimmten Richtungen möglich (Richtungsquantelung), wobei die Anzahl der Einstellmöglichkeiten durch die Kernspinquantenzahl bestimmt wird.

Der Übergang von einem in ein anderes Energieniveau ist möglich, wenn der Spin seine Ausrichtung (parallel  $\leftrightarrow$  antiparallel) wechselt. Diese Übergänge werden möglich, wenn die eingestrahlte Energie der Resonanzfrequenz des anzuregenden Spins entspricht.

Detektiert wird die Energie, die bei der Rückkehr des Spins in seinen Ausgangszustand emittiert wird (Relaxation). Bedingt durch die Wechselwirkung mit den umliegenden Kernen und Elektronen im Molekül ist die effektive Feldstärke geringer als die angelegte. Dieser als Abschirmung bezeichnete Effekt führt zu einer Verschiebung der Resonanzlinien (chemische Verschiebung) im Vergleich zum isoliert vorliegenden Kern. Durch Zugabe eines Standards kann die Verschiebung, d. h. die Lage des Signals mit

$$\delta = \frac{\nu_{\text{Substanz}} - \nu_{\text{Standard}}}{\nu_0} \quad (2.7)$$

bestimmt werden.  $\nu_0$  bezeichnet die Betriebsfrequenz des Spektrometers und  $\delta$  die chemische Verschiebung, die in ppm angegeben wird.

Die Messungen wurden an einem DPX 300 von Bruker ( $B = 7,04 \text{ T}$ ) in  $\text{D}_2\text{O}$  vorgenommen.

### 2.3.2 Röntgenbeugungsmethoden<sup>[55, 56]</sup>

Röntgenbeugungsmethoden beruhen analog der Beugung des sichtbaren Lichts an Spalt oder Gitter auf der Beugung von Röntgenstrahlung am Kristallgitter. Um Interferenzerscheinungen beobachten zu können, muss die Wellenlänge der verwendeten Strahlung in der Größenordnung der Gitterkonstanten des Kristalls liegen. Die Braggsche Gleichung



$$n \cdot \lambda = 2d \cdot \sin \Theta \quad (2.8)$$

gibt den Zusammenhang zwischen der Wellenlänge  $\lambda$ , dem Einfallswinkel  $\Theta$  und dem Netzebenenabstand  $d$  wieder, wobei  $n$  die Beugungsordnung beschreibt.

Bedingt durch die im Ångströmbereich liegenden Gitterkonstanten von Kristallen eignet sich Röntgenstrahlung zur Untersuchung der Struktur. Die so gemessenen Diffraktogramme sind charakteristisch für die jeweilige Kristallstruktur. Mit Hilfe von Datenbanken wie der des ICDD (*International Centre for Diffraction Data*) kann das Diffraktogramm der entsprechenden Kristallstruktur zugeordnet werden.

### 2.3.2.1 Röntgenpulverdiffraktometrie

Für die Aufnahme eines Röntgenpulverdiffraktogramms werden gut gemörserte Proben verwendet. Bedingt durch die im Pulver auftretende zufällige Ausrichtung der Kristallite zeichnen sich Pulverdiffraktogramme durch Reflexe vieler verschiedener Netzebenen unterschiedlicher Intensität aus, bei denen die Intensität gegen den Beugungswinkel in ( $2\Theta$ ) aufgetragen wird. Gerade in Flachproben kommt es allerdings oft zu einer gerichteten Anordnung der Kristallite, wodurch die relative Intensität der Beugungsreflexe variieren kann. Die Lage der Beugungsreflexe hängt hingegen nur von der Wellenlänge ab und ist demnach bei gleicher Wellenlänge konstant. Da ein Pulver einer Substanz als eine Mischung kleiner Einkristalle dieser Substanz betrachtet werden kann, ist das Pulverdiffraktogramm charakteristisch für die Atomanordnung im Einkristall, weshalb z. B. Polymorphe des Calciumcarbonats (Calcit, Aragonit und Vaterit) unterschieden werden können.

Mit Hilfe der Scherrer-Gleichung 2.9 kann über die Halbwertsbreite eines Reflexes  $\beta_{hkl}$  (in rad), den Beugungswinkel  $\Theta$  (in rad) und die Wellenlänge  $\lambda$  (in Å) die Kristallitgröße  $D_{hkl}$  (in Å) abgeschätzt werden.

$$D_{hkl} = \frac{K \cdot \lambda}{\beta_{hkl} \cdot \cos \Theta} \quad (2.9)$$

$K$  bezeichnet einen Formfaktor, der typischerweise zwischen 0,8 und 1,2 liegt und in dieser Arbeit als  $K = 1$  angenommen wird.

In dieser Arbeit wurden alle Materialien alle als Flachproben auf Kapton-Folien in

Transmission untersucht. Die Arbeiten wurden an einem STOE IP-PSD-Diffraktometer mit Cu-K $\alpha$ -Strahlung mit einem primären Ge(111)-Monochromator und einem ortsempfindlichen Halbkreis-PSD (*position sensitive device*) durchgeführt. Die hochauflösenden Untersuchungen wurden an der Beamline B2 am HASYLAB (Hamburger Synchrotronstrahlungslabor) im DESY (Deutsches Elektronensynchrotron) mit einer Halbkreis-PSD durchgeführt<sup>[57, 58]</sup>. Die Wellenlänge betrug  $\lambda = 1,183 \text{ \AA}$ . Zur besseren Vergleichbarkeit wurden alle Daten in Cu-K $\alpha$ -Strahlung ( $\lambda = 1,541 \text{ \AA}$ ) konvertiert.

### 2.3.2.2 Einkristalldiffraktometrie

Kristalle werden durch Einkristalldiffraktometrie analysiert. Aus den Daten ist es möglich, die genaue Lage der Atome im Kristallgitter zu bestimmen und die Kristallstruktur zu lösen.

Die Messungen fanden an der Beamline F1 am HASYLAB (Hamburger Synchrotronstrahlungslabor) im DESY (Deutsches Elektronensynchrotron) statt. Es wurde mit einer Wellenlänge von  $\lambda = 0,710 \text{ \AA}$  und einer Schrittweite von  $\Delta\omega = 0,5^\circ$  gearbeitet. Die Belichtungszeit wurde je nach Kristallgröße und Streuvermögen nach optimaler Intensitätsausbeute gewählt. Die Proben waren mit Cyanacrylat umhüllt und an einem Kohlefaden fixiert, um sie so vor Luftfeuchtigkeit zu schützen. Ein Glasfaden verband Kohlefaden und Probenträger miteinander. Die mittels CCD-Detektor aufgenommenen digitalen Bilder wurden mit der Integrationssoftware XDS-Program-Package (*X-ray Detector Software*) von W. J. Kabsch<sup>[59]</sup> integriert.

Es wurde versucht, die resultierenden hkl-Datensätze mit SHELXTL von Bruker<sup>[60]</sup> zu lösen. Dies führten zu keinem Ergebnis (s. Kapitel 3.3.1).

### 2.3.3 Thermogravimetrische Analyse<sup>[61, 62]</sup>

Bei der thermogravimetrischen Analyse (TGA) wird eine Probe in inerter oder reaktiver Atmosphäre (z. B. Stickstoff oder Sauerstoff) einem definierten Temperaturprogramm unterworfen und deren Massenänderung verfolgt. Messgröße ist die durch Reaktion oder Zerfall hervorgerufene Änderung der Probenmasse als Funktion von Temperatur und/oder Zeit. Mit Hilfe der Massenänderungen kann der Anteil der Einzelkomponenten der Probe bestimmt werden. Nachgeschaltete Analysen der entweichenden Gase (hier ein IR-Spektrometer) geben weitere Auskunft über die Zersetzungsprodukte.

Die TGA-Messungen dieser Arbeit wurden in  $\text{Al}_2\text{O}_3$ -Tiegeln in Sauerstoffatmosphäre (Durchfluss  $50 \text{ mL min}^{-1}$ ) in einer Thermowaage von Netzsch (TGA V STA 409 PC) mit TGA-IR-Kopplung (Vertex 70 der Firma Bruker) durchgeführt. Die Proben wurden von  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  auf  $1200 \text{ }^\circ\text{C}$  mit einer Heizrate von  $2 \text{ K min}^{-1}$  erhitzt.

#### 2.3.4 Elektronenmikroskopie und Energiedispersive Röntgenspektroskopie (EDX)<sup>[63]</sup>

Die in optischen Mikroskopen erreichbare Auflösung ist nach E. K. Abbé von der Wellenlänge  $\lambda$  des verwendeten Lichtes und dem Durchmesser  $A$  der Apertur abhängig:

$$d_n = \frac{\lambda}{A} \quad (2.10)$$

Hierbei bezeichnet  $d_n$  den Abstand der Punkte, die gerade noch aufgelöst werden können. Dieser Zusammenhang gilt gleichermaßen sowohl für Licht- als auch für elektronenoptische Mikroskope. Durch die im Elektronenmikroskop beschleunigten Elektronen lässt sich die Wellenlänge des verwendeten „Lichts“ verkürzen. Zusätzlich sind die Aperturen mindestens um den Faktor zehn kleiner, woraus Auflösungen im Subnanometerbereich resultieren.

Man unterscheidet prinzipiell zwischen der Transmissionselektronenmikroskopie, die innere Strukturen dünner Proben abbilden kann und der Rasterelektronenmikroskopie, die Oberflächenmorphologien abbildet.

Um Streuung des Elektronenstrahls oder emittierter Sekundärelektronen zu vermeiden, ist das Arbeiten im Hochvakuum notwendig. Neuere Geräte der Rasterelektronenmikroskopie (ESEM – *enviromental scanning electron microscope*) erlauben das Arbeiten bei hohen Drücken (20 hPa), in bestimmten Inertgasen oder bei einer bestimmten Luftfeuchte. Diese neuen Möglichkeiten gehen allerdings zu Lasten der Auflösung.

Neben frei werdenden Sekundär- oder gebeugten Primärelektronen entstehen beim Auftreffen des Elektronenstrahls auf die Probe auch Röntgenstrahlen. Diese Röntgenstrahlung ist abhängig von der Ordnungszahl des jeweiligen Elements und somit charakteristisch für die in der Probe vorhandenen Elemente (Moseleysches Gesetz). Energiedispersive Röntgendetektoren (EDX) können diese Strahlung aufnehmen und so die chemische Zusammensetzung der bestrahlten Probenoberfläche bestimmen.

Der Nachweis beschränkt sich allerdings auf qualitative Analysen und ist nur in Maßen quantitativ auswertbar. Mit so genannten „Mappingfunktionen“ kann ein Probenbereich orts aufgelöst nach seiner prozentualen Elementzusammensetzung dargestellt werden.

#### 2.3.4.1 Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)

Bei der Transmissionselektronenmikroskopie werden zuvor präparierte Dünnschnitte (maximal 0,3  $\mu\text{m}$  Dicke) mit einem Elektronenstrahl ähnlich der Lichtmikroskopie zur Strukturabbildung durchstrahlt. Für die Bilderzeugung sind drei signifikante Interaktionen von Probe und Elektronen maßgeblich:

- Transmission      Die Elektronen passieren ungebeugt die Probe
- Elastische Streuung      Sie resultiert aus der Wechselwirkung der Strahlelektronen mit den Atomkernen der Probe. Die Elektronen werden gebeugt, verlieren aber nahezu keine Energie. Elastisch getreute Elektronen tragen sowohl zum Beugungs- als auch zum Amplitudenkontrast im Bild bei.
- Inelastische Streuung      Die Elektronen treten in Wechselwirkung mit den Elektronenhüllen der Probe und werden nur wenig aus ihrer Bahn abgelenkt. Sie trägt zum Phasenkontrast bei.

Mit dem Einfügen von Aperturblenden kann eine Trennung von gebeugten und ungebeugten Elektronen vollzogen werden, so dass Helligkeitsunterschiede verschieden stark gestreuter Elektronen sichtbar werden. Gründe für unterschiedliches Streuvermögen einer Probe sind Materialdefekte und unter anderem Unterschiede in der Probendicke, Dichte, Kristallorientierung, Modifikation und in der chemischen Zusammensetzung. Mit der Transmissionselektronenmikroskopie sind mittlerweile Auflösungen von unter 2 Å und somit auch die Betrachtung von Netzebenen in Kristallen bis hin zur Auflösung einzelner Atome möglich.

Die Dünnschnitte für die Transmissionselektronenmikroskopie wurden mit einem Mikrotom MT-XL (RMC) mit einem Diamantmesser ultra 45° (DiATOME AG) angefertigt. Die Proben wurden dazu in Epoxid nach Spurr<sup>[64]</sup> oder ein anderes Epoxidharz (Araldite CY 212) eingebettet. Die TEM-Aufnahmen wurden mit einem JEOL JEM 1200 EX; 120 keV mit einem Oxford EDX-Detektor in Bristol angefertigt.

#### 2.3.4.2 Rasterelektronenmikroskopie (REM) und *Focussed Ion Beam* (FIB)

Die Rasterelektronenmikroskopie arbeitet mit einem die Probe kontinuierlich abrasierenden Elektronenstrahl. Die bei Interaktion von Probenoberfläche und Elektronenstrahl entstehenden Sekundärelektronen werden durch das positiv geladene Absauggitter angezogen, zum Detektor hin beschleunigt und vor der Umsetzung in ein Bild mehrfach verstärkt. Die Anzahl der emittierten Elektronen bestimmt später die Helligkeit der Bildoberfläche. Die Sekundärelektronenausbeute hängt von der Elektronenstrahlenergie, dem Neigungswinkel zwischen Probe und Primärstrahl und der Ordnungszahl des Elementes ab. Kanten emittieren besonders viele Sekundärelektronen, was als Kanteneffekt beschrieben wird.

Um elektrostatische Aufladungen nichtleitender Proben zu vermeiden, werden diese mit dünnen Filmen aus Gold oder Gold/Palladium besputtert. Kommt es dennoch zu einer solchen Aufladung, so wird infolgedessen der Elektronenstrahl an dieser Stelle abgelenkt, was zu weißen Streifen im Bild führt.

Die Methode des fokussierten Ionenstrahls (FIB – *focused ion beam*) arbeitet ähnlich einem Rasterelektronenmikroskop. Anstelle eines Elektronenstrahls rastert ein stark fokussierter Galliumionenstrahl die Probe ab. Geringe Strahlintensitäten können für Oberflächenabbildungen genutzt werden, hohe Strahlintensitäten ermöglichen das gezielte Abtragen von Probenmaterial und somit neben Ausdünnungen auch Schnitte.

Die REM-Bilder wurden an einem LEO S420 von LEICA mit goldbesputterten Proben aufgenommen. Arbeiten an biologischen Proben wurden mit dem ESEM Quanta 400 gemacht. Die mit Gold/Palladium besputterten Herzklappen und -beutel wurden im Hochvakuum mit SE-Detektor betrachtet. Schnitte der Quallenstatolithen als auch Aufnahmen der Biofilme wurden im ESEM-Mode im Niedrigvakuum mit LF-GSED-Detektor ohne leitfähige Schichten aufgenommen.

Die Untersuchungen mit dem FIB wurden in Kooperation mit D. Raabe am Max-Planck-Institut für Eisenforschung (Düsseldorf) an einem Zeiss B1560-Kreuzstrahlequipment mit Feldemissionselektronenquelle und Ga<sup>+</sup>-Ionen-Emitter in Zusammenarbeit mit H. Fabritius durchgeführt.

#### 2.3.5 Kritische-Punkt-Trocknung (*Critical Point Drying*)<sup>[65]</sup>

Biologische Proben müssen vor der Untersuchung im Rasterelektronenmikroskop getrocknet werden. Um Trocknungsartefakte zu minimieren, werden zwei Methoden angewandt. Nach geeigneter Fixierung der Proben können diese gefriergetrocknet

(Schockgefrieren und Sublimation des Eises im Hochvakuum) oder mit der Kritischen-Punkt-Trocknung präpariert werden.

In dieser Arbeit wurde die Kritische-Punkt-Trocknung eingesetzt. Für diese werden die Proben über eine Verdünnungsreihe in Aceton überführt, so dass das enthaltene Wasser komplett durch das Lösungsmittel substituiert wird.

In der Kritischen-Punkt-Trocknungsanlage wird nun schrittweise das Lösungsmittel gegen überkritisches  $\text{CO}_2$  ausgetauscht. Durch anschließende Temperatur- und Druckerhöhung über den kritischen Punkt des  $\text{CO}_2$  hinaus entweicht dieses als Gas und lässt trockenes Probenmaterial zurück, welches nun für die Elektronenmikroskopie verwendet werden kann.

### 3. Ergebnisse

Im vorliegenden Kapitel werden acht verschiedene Projekte beschrieben, die im Laufe der Dissertation bearbeitet wurden. Neben der Charakterisierung von Biomineralien und der sie umgebenden, organischen Matrix wurde zudem in verschiedenen Ansätzen die Nachahmung der Biomineralisation untersucht. Je nach Fragestellung wurden vier verschiedene Kristallisationsmethoden verwendet, die für das zu untersuchende biologische Vorbild geeignet erschienen.

#### 3.1 Calciumcarbonat

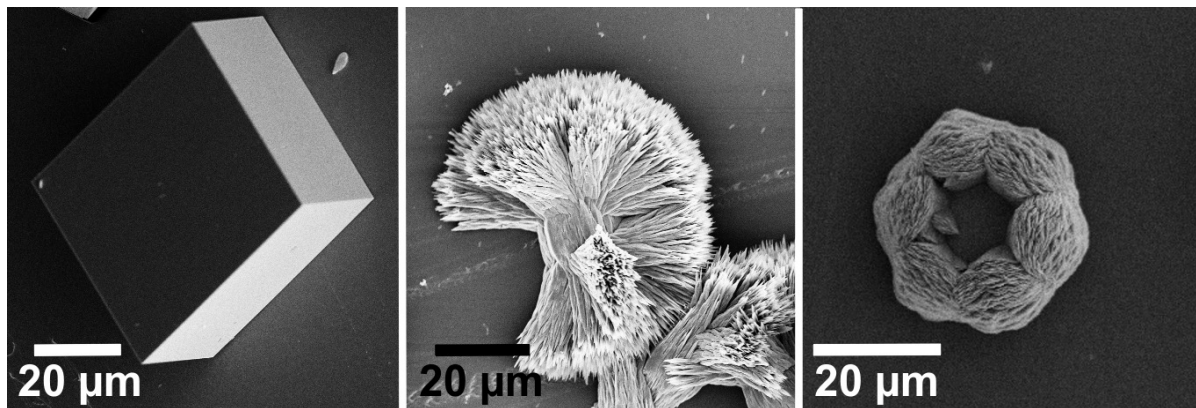
Calciumcarbonat ist ein schwer wasserlösliches, weit verbreitetes Mineral, das geologisch u. a. als Kalkstein, Kreide und Marmor zu finden ist. Industriell wird es überwiegend in der Bauindustrie genutzt, findet aber auch Anwendung als Füllstoff oder als Schleifmittel.  $\text{CaCO}_3$  kristallisiert in den drei wasserfreien Polymorphen Calcit, Aragonit und Vaterit. Daneben sind noch Monohydrocalcit und Ikaite als wasserhaltige Polymorphe zu finden. In Tabelle 3.1.1 sind die Eigenschaften der Polymorphe zusammengefasst.

**Tab. 3.1.1:** Mineralogische Eigenschaften der Polymorphe von  $\text{CaCO}_3$

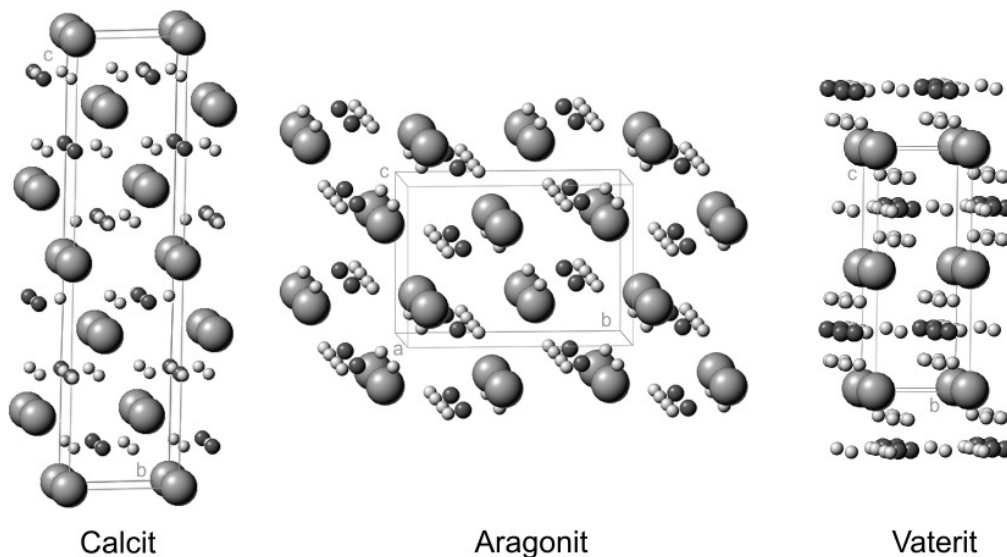
Mineralname	Calcit <sup>[66]</sup>	Aragonit <sup>[67, 68]</sup>	Vaterit <sup>[69]</sup>	Monohydrocalcit <sup>[70]</sup>	Ikaite <sup>[71]</sup>
Summenformel	$\text{CaCO}_3$	$\text{CaCO}_3$	$\text{CaCO}_3$	$\text{CaCO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$	$\text{CaCO}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
Kristallsystem	trigonal	orthorhombisch	hexagonal	hexagonal	monoklin
Dichte / $\text{g cm}^{-3}$	2,72	2,95	2,64	2,38	1,78
Mohs-Härte	3	3,5-4	3	2-3	2
Thermodynamische und kinetische Stabilität	stabilste Phase bei 25 °C, 1013 hPa	stabilste Phase bei >70 °C, 1013 hPa bzw. 25 °C, 600 MPa	metastabil bei <15 °C, 1013 hPa, neigt zur Umwandlung	Bodensediment kalter Gewässer (Wasserabgabe oberhalb 60-80 °C)	Bildung bei 0-4 °C, hohem $\text{CO}_2$ -Partialdruck im basischen Milieu

Calcit ist das mengenmäßig häufigste und unter normalen Bedingungen thermodynamisch stabilste Mineral, das für seine Eigenschaft zur Doppelbrechung bekannt ist (Abb.3.1.1 links). Die Koordination des Calcits entspricht der Natriumchlorid-Struktur, dessen Elementarzelle zu einem Rhomboeder verzogen ist. Sie baut sich senkrecht zur *c*-Achse aus alternierenden Calcium- und Carbonatschichten auf. Die Struktur der Carbonatanionen ( $\text{CO}_3^{2-}$ ) ist trigonal planar. Mit dem in der Mitte liegenden Kohlenstoffatom bilden die drei umgebenden Sauerstoffatome O-C-O-

Bindungswinkel von  $120^\circ$ . Sie sind innerhalb einer Schicht identisch orientiert. Nachfolgende Schichten orientieren sich jeweils in entgegengesetzter Richtung (Abb. 3.1.2 links). Die Kristallstruktur des nadelförmig kristallisierenden Aragonits (Abb. 3.1.1 Mitte) ist ebenso aus alternierenden Calcium- und Carbonatschichten entlang der  $c$ -Achse aufgebaut.



**Abb. 3.1.1:** REM-Aufnahmen der drei  $\text{CaCO}_3$ -Polymorphe. Calcit ist durch seine rhomboedrische Gestalt charakterisiert, während Aragonit nadelförmige Strukturen bildet. Der thermodynamisch instabile Vaterit setzt sich aus Plättchen zusammen, die an Blumen erinnern.



**Abb. 3.1.2:** Schematische Darstellung der Kristallstrukturen und der Elementarzellen von Calcit (links), Aragonit (Mitte) und Vaterit (rechts). Deutlich ist die alternierende Abfolge der parallel zueinander angeordneten  $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{CO}_3^{2-}$ -Schichten in allen drei Polymorphen zu erkennen, die senkrecht zur  $c$ -Achse angeordnet sind. Calciumatome – grau, Kohlenstoffatome – schwarz, Sauerstoffatome – hellgrau.



Im Unterschied zum Calcit sind die Carbonatanionen nicht mehr in einer Ebene angeordnet, sondern orientieren sich abwechselnd näher an den umgebenden Calciumschichten, so dass zwei Carbonatschichten ausgebildet werden. Diese parallel zur *a*-Achse verlaufenden Schichten sind abwechselnd um 180° gedreht ausgerichtet (Abb. 3.1.2 Mitte). Das thermodynamisch instabilste Polymorph Vaterit bildet polykristalline Plättchen (Abb. 3.1.1 rechts), die eine hexagonale Kristallstruktur aufweisen. Die  $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{CO}_3^{2-}$ -Gruppen bilden auch hier alternierende Schichten. Im Unterschied zu Calcit und Aragonit orientieren sich die  $\text{CO}_3^{2-}$ -Moleküle allerdings nicht parallel zur *a*-Achse, sondern stehen senkrecht auf ihr und somit parallel zur *c*-Achse (Abb. 3.1.2 rechts).

Zu den aufgeführten Polymorphen des  $\text{CaCO}_3$  ist ergänzend amorphes Calciumcarbonat (ACC) als instabiles Zwischenprodukt<sup>[72]</sup> zu nennen, das vor allem in Biomineralien<sup>[73-76]</sup> zu finden ist. Untersuchungen haben gezeigt, dass ACC in einigen Biomineralien bei genauer Betrachtung eine der drei Morphologien bereits in seiner Nahordnung erkennen lässt<sup>[3, 77-79]</sup>. Mengenmäßig ist  $\text{CaCO}_3$  das wichtigste Biomineral<sup>[14]</sup>. Dies ist unter anderem in der Übersättigung des Meerwassers mit  $\text{CaCO}_3$  begründet, so dass viele marine Organismen es leicht kristallisieren können.

Neben Schalen von Mollusken findet man  $\text{CaCO}_3$  auch in Korallen<sup>[80]</sup>, Foraminiferen<sup>[81, 82]</sup>, Exoskeletten<sup>[6, 83]</sup>, Stacheln<sup>[84]</sup> und in Otolithen (Gehörsteinchen)<sup>[85, 86]</sup>.

Die Kristallisation von  $\text{CaCO}_3$  hängt in wässriger Lösung stark vom pH-abhängigen Säure-Base-Gleichgewicht der mittelstarken Kohlensäure ( $\text{H}_2\text{CO}_3$ ) in ihren verschiedenen Dissoziationsstufen ab. Bei der Lösung von  $\text{CO}_2$  in Wasser stehen folgenden Reaktionen im Gleichgewicht<sup>[87]</sup>:

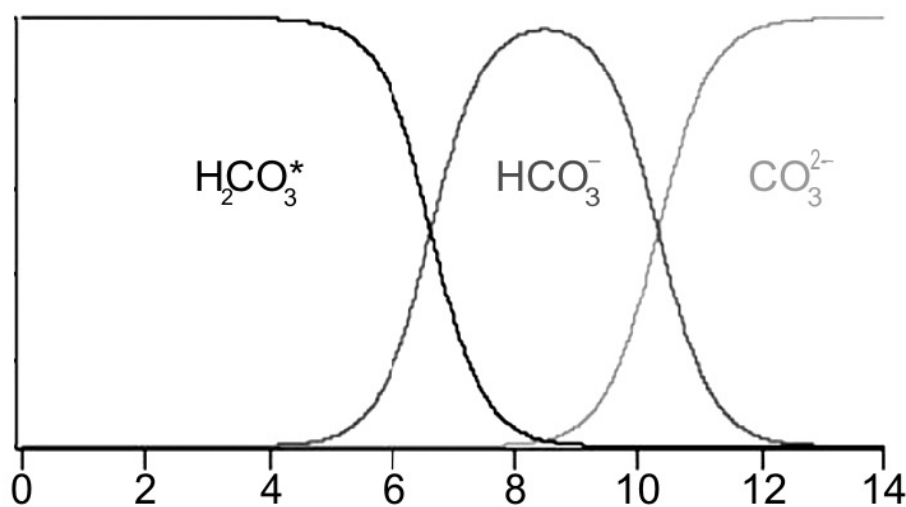


Da in Reaktion 3.1 nur wenige Moleküle im Wasser zu  $\text{H}_2\text{CO}_3$  reagieren und das gesamte System als schwache Säure wirkt, bezieht sich die Säurekonstante in Gleichung 3.2 auf diese gelöste Kohlensäure  $\text{H}_2\text{CO}_3$ : Werden allerdings Gleichung 3.1 und 3.2 zusammengefasst, so kann die Säurekonstante auf  $\text{CO}_2$  bezogen werden:



$\text{H}_2\text{CO}_3^*$  ist hier definiert als die Summe des gelösten  $\text{CO}_2$  und der Menge des in der Lösung befindlichen  $\text{H}_2\text{CO}_3$ . Der  $\text{pK}_s$  in Gleichung 3.4 beschreibt die effektive Säuredissoziationskonstante der Reaktion<sup>[88]</sup>.

Die drei unterschiedlichen Carbonate ( $\text{H}_2\text{CO}_3^*$ ,  $\text{HCO}_3^-$  und  $\text{CO}_3^{2-}$ ) und ihre pH-abhängige Konzentration sind in Abbildung 3.1.3 dargestellt.



**Abb. 3.1.3:** Verteilung der unterschiedlichen Carbonate als Funktion des pH-Wertes der Lösung.  $\text{H}_2\text{CO}_3^*$  ist definiert als die Summe aus gelöstem  $\text{CO}_2$  und der vorhandenen Menge an  $\text{H}_2\text{CO}_3$ <sup>[89]</sup>.

Im biologischen System werden die beschriebenen Carbonatspezies mit Additiven stabilisiert. Das Carbonat-Anion kann mit Hilfe der Additive ausgefällt oder in organische Gerüste hinein kristallisiert werden. Das Ziel von Kristallisationsexperimenten im Bereich der Biomineralisationsforschung ist es, diese Stabilisierungs- und Formgebungsprozesse der biologischen Additive zu verstehen und im optimalen Fall auch nachzuahmen.

Bedingt durch die Verbreitung von  $\text{CaCO}_3$  unter den Biomineralien, durch das aufkeimende Interesse für diese Materialien und durch die Verwendung von  $\text{CaCO}_3$  in der Industrie wurden bereits verschiedenste Experimente durchgeführt, bei denen Additive oder Herstellungsverfahren das entstehende Polymorph dirigieren oder Kristallflächen inhibieren sollen<sup>[90]</sup>. Verschiedene anorganische Ionen wie  $\text{Mg}^{2+}$ <sup>[91, 92]</sup>, aber auch Additive wie Alkohole<sup>[93]</sup> oder biologische<sup>[94-97]</sup> und synthetische<sup>[29, 98-101]</sup>

Polymere wurden als Zusatz frei in Lösung bereits hinsichtlich ihres Einflusses auf die Kristallisation untersucht. Ebenso wurden die genannten Additive auf Oberflächen immobilisiert bei der Kristallisation eingesetzt und ihr Nutzen als polymorph-dirigierende Kristallisationsmatrix erforscht. Die Kristallisation von  $\text{CaCO}_3$  ist bereits in Gelen<sup>[102-104]</sup> und in Mikroemulsionen<sup>[50, 51, 105]</sup> untersucht worden<sup>[106]</sup>.

### 3.1.1 Charakterisierung von Crustaceenpanzern

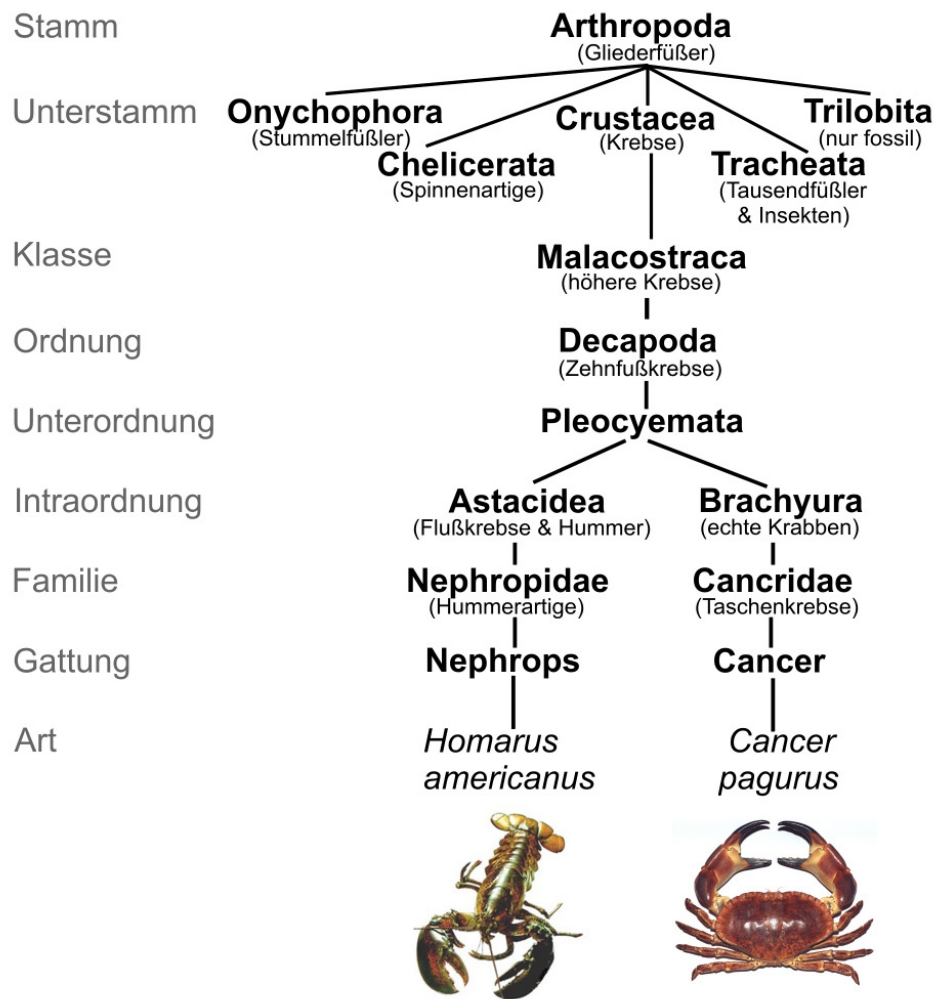
Der Tierstamm der Arthropoden (Gliederfüßler) gliedert sich in die Unterstämme Stummelfüßler (Onychophora), Spinnentiere (Chelicerata), Insekten und Tausendfüßler (Tracheata), Krebse (Crustacea) und die fossilen Trilobita. Die Spezialisierungsmöglichkeiten ihrer gegliederten Extremitäten in Lokomotions- und Sinnesorgane, Mundwerkzeuge oder Begattungsapparate ermöglichte den Arthropoden die Ausbreitung an Land, zu Wasser und in der Luft. Über Dreiviertel der lebenden und fossilen Tiere der Erde gehören diesem artenreichsten Tierstamm an. Allen gemein ist neben den gegliederten Extremitäten die Ausbildung eines Cuticularskeletts, welches ihnen im Laufe der Evolution erst das Landleben ermöglichte. Dieses setzt sich zusammen aus der Epicuticula, der Exocuticula und der Endocuticula<sup>[107, 108]</sup>. Die dünne wachsartige Epicuticula dient als Diffusionsbarriere zur Umwelt. An diese schließen sich die sklerotisierte, als Schutz dienende Exocuticula und die elastische, da nicht sklerotisierte Endocuticula an, die beide aus einem Chitin-Protein-Gerüst aufgebaut sind (Bouligand-Struktur)<sup>[109-111]</sup>.

Bei den Crustaceen sind die beiden letztgenannten Schichten mineralisiert und enthalten beträchtliche Mengen nanoskopisches Calciumcarbonat. Dies liegt zumeist amorph oder als nanokristalliner Calcit vor<sup>[12, 14, 76, 112]</sup>.

Bedingt durch ihre Struktur<sup>[113]</sup> und die daraus resultierenden mechanischen Eigenschaften<sup>[6, 114]</sup> ist die Cuticula der Crustaceen ein interessantes Kompositmineral, welches für die Entwicklung neuer intelligenter Werkstoffe geeignet scheint.

Für die vergleichende Untersuchung wurden Schalen des amerikanischen Hummers *Homarus americanus*<sup>[115]</sup> und des Taschenkrebsses *Cancer pagurus*<sup>[116]</sup> verwendet. Während der Hummer Schutz zwischen Felsen in kaltem Wasser bis zu Tiefen von 400 m an der Küste Nordamerikas sucht, lebt der zu den echten Krabben gehörende Taschenkrebs auf sandigem oder felsigem Meeresboden in der Nordsee, dem Atlantik und dem Mittelmeer und ganz allgemein in küstennahen Kaltwasserregionen in Tiefen von 30 bis 50 m. Beide Arten zählen zu den höheren Krebstieren

(Malacostraca). Ihre Verwandtschaftsbeziehung ist in Abbildung 3.1.4 aufgezeigt.



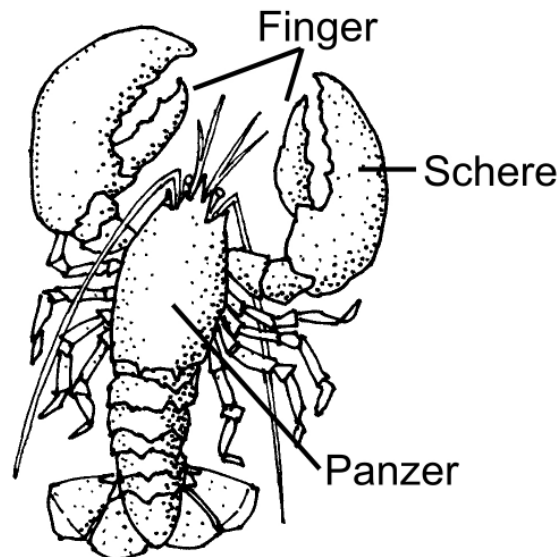
**Abb. 3.1.4:** Phylogenetischer Stammbaum der zu den Arthropoden gehörenden Versuchstiere.

Im Unterschied zum Hummer hat der Taschenkrebs seinen Hinterleib zu einer Schwanzplatte umgebildet, die er gegen seinen Bauch presst. Der Hummer ernährt sich hauptsächlich von toten Meerestieren, zu denen auch Schnecken und Stachelhäuter zählen und abgestorbenen Pflanzen, während der Taschenkrebs neben Aas auch lebende Muscheln, Stachelhäuter und Artgenossen als Nahrungsquelle nutzt. Ziel dieser Arbeit war die vergleichende Charakterisierung der Cuticulae beider Arten hinsichtlich der Zusammensetzung ihrer Mineralphase.

### 3.1.1.1 Experimentelle Vorgehensweise

Die von den Kooperationspartnern H. Fabritius, P. Romano und D. Raabe präparierten und eingefrorenen Schalenproben wurden kurz vor der Verwendung aufgetaut.

Für die Untersuchungen wurden je eine Schere und ein Finger als auch Teile des Panzers der beiden Crustaceen verwendet (Abb. 3.1.5) und in einer Planetenkugelmühle (pulverisette 6, Fritsch) für 3-5 Stunden in einem Achatmörser bei  $500 \text{ U min}^{-1}$  zu einem Pulver zermahlen.



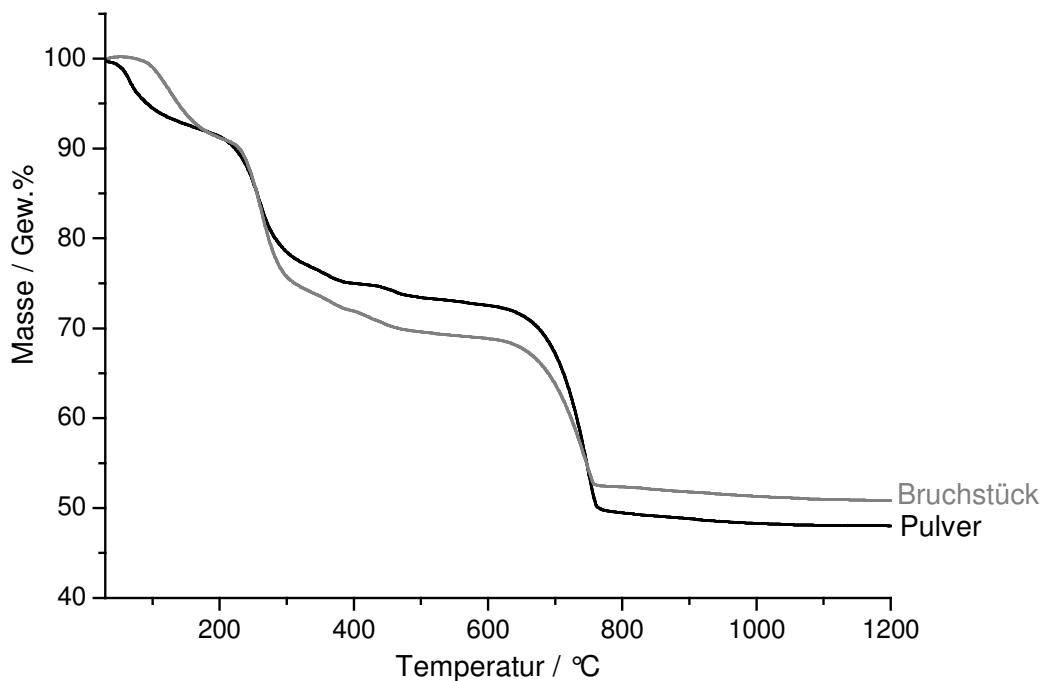
**Abb. 3.1.5:** Schematische Darstellung eines Hummers zur Verdeutlichung der entnommenen und charakterisierten Probenstücke. Im Gegensatz zum Hummer liegt bei der Krabbe der zur Schwanzplatte umgebildete Hinterleib (Pleon) umgeklappt unter dem Kopfbruststück (Cephalothorax) an. Die Lage der untersuchten Schalenteile ist identisch.

Diese Pulver wurden in der Thermowaage mit einer Heizrate von  $2 \text{ K min}^{-1}$  auf  $1200 \text{ °C}$  in dynamischer Sauerstoffatmosphäre ( $50 \text{ mL min}^{-1}$ ) erhitzt. Der Calcium- und Magnesiumgehalt der Pulver wurde mittels Atomabsorptionsspektroskopie (AAS, Solaar MSM2 von Thermo E mit Graphitrohrtechnik) bestimmt. Vor der Messung wurde das Pulver rückstandsfrei in konzentrierter HCl gelöst. Phosphatanalysen wurden mit einem UV-VIS-Spektrometer Cary 1 Bio (Varian) als Phosphatmolybdänblaukomplex bestimmt. Für die Analysen wurden Sechsfachbestimmungen durchgeführt. Zudem wurden Diffraktogramme der gemahlenen Proben vor und nach der Temperaturbehandlung aufgenommen.

### 3.1.1.2 Ergebnisse und Diskussion

Für die Bestimmung einer möglichen amorphen Phase im XRD müssen die Schalen zu einem Pulver vermahlen werden. Untersuchungen ungemahlener Schalenteile sind im Pulverdiffraktometer nicht möglich. Um die Vergleichbarkeit der Ergebnisse

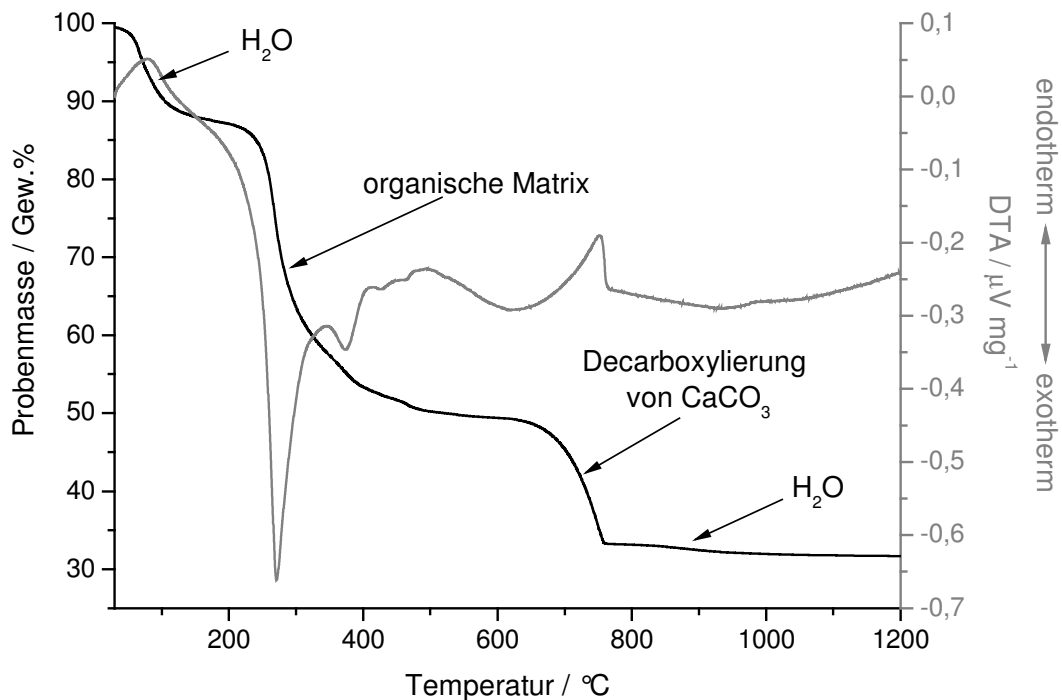
untereinander zu gewährleisten und eine mögliche Veränderung der Proben durch den Mahlvorgang zu detektieren, wurde vom Hummerfinger nicht nur das gemahlene Pulver analysiert, sondern auch ein zuvor entferntes Bruchstück des gleichen Tieres dem selben TGA-Programm unterworfen. Damit sollte sichergestellt werden, dass die Behandlung in der Kugelmühle keinen Einfluss auf das Probenmaterial hinsichtlich der TGA-Messungen hat. Die beiden Kurvenverläufe sind in Abbildung 3.1.6 zusammengefasst.



**Abb. 3.1.6:** TGA-Untersuchungen des gemahlene Pulvers (schwarze Kurve) und des Bruchstückes des Hummerfingers (graue Kurve) in Sauerstoffatmosphäre ( $50 \text{ mL min}^{-1}$ ) mit einer Heizrate von  $2 \text{ K min}^{-1}$ .

Die Graphik zeigt, dass es geringfügige Unterschiede zwischen den beiden Proben gibt, die im Rahmen der Messgenauigkeit vernachlässigbar klein sind und daher nicht weiter berücksichtigt werden. In Abbildung 3.1.7 ist beispielhaft für alle untersuchten Proben die thermogravimetrische Messung des Hummerpanzers dargestellt. Die vorliegende TGA-Kurve zeigt eine gute Übereinstimmung mit der DTA-Kurve. Nach einem in der DTA sichtbaren endothermen Wasserverlust zeigt sich deutlich die exotherme Verbrennung der organischen Komponenten. Es schließt sich die endotherme Decarboxylierung von  $\text{CaCO}_3$  zu  $\text{CaO}$  an. Der letzte zu beobachtende Massenverlust kann der Abspaltung von Wasser aus Hydroxylapatit zugeschrieben werden. Der Temperaturbereich, in dem die einzelnen Bestandteile zerfallen und

eine Massenabnahme ersichtlich ist, sind in Tabelle 3.1.2 exemplarisch für den Hummerpanzer aufgeführt.



**Abb. 3.1.7:** TGA-Messung des Hummerpanzers in Sauerstoffatmosphäre mit einer Probenmasse von 111,0 mg.

**Tab. 3.1.2:** Ergebnisse der TGA-Messung des Hummerpanzers aus Abbildung 3.1.7 mit einer Probenmasse von 111,0 mg

Bestandteil	$T / ^\circ\text{C}$	Masse / Gew.%	Masse / mg
Wassergehalt	33 - 168	11,8	13,1
organische Matrix	168 - 603	38,2	42,4
CO <sub>2</sub> -Verlust von CaCO <sub>3</sub>	603 - 769	16,1	17,9
H <sub>2</sub> O-Verlust von HAP	769 - 1200	1,6	1,8
verbleibende Masse	1200	32,3	35,8

Die Summe aus der verbleibenden Masse, dem CO<sub>2</sub>-Verlust und der Wasserabgabe aus HAP ergibt den gesamten Mineralgehalt der Probe. In Tabelle 3.1.3 sind die Daten aus TGA, AAS und UV zusammengestellt und zueinander in Verbindung gesetzt worden. Zu den einzelnen Berechnungen finden sich die zugehörigen Gleichungen im Anschluss an die Tabelle.

Betrachtet man die einzelnen Proben untereinander, so fällt auf, dass die Hummer-

schere den höchsten Wassergehalt hat. Im Hummerpanzer findet sich der höchste Anteil an organischem Material.

**Tab. 3.1.3:** Zusammenfassung und Auswertung aller Messergebnisse aus AAS, UV-Spektroskopie und TGA der Hummer- und Taschenkrebssproben.

Ergebnis	analysierter Wert	Methode	Hummer			Taschenkrebss		
			Finger	Panzer	Schere	Finger	Panzer	Schere
1	Ca <sup>2+</sup> / Gew.%	AAS	22,95	17,26	18,49	27,79	21,98	23,46
2	Mg <sup>2+</sup> / Gew.%	AAS	1,01	0,98	1,16	0,99	1,25	1,39
3	PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> / Gew.%	UV	4,35	6,35	2,03	1,20	3,37	2,75
4	Wassergehalt / Gew.%	TGA	7,3	11,8	19,0	1,0	11,8	9,9
5	organische Matrix / Gew.%	TGA	19,7	38,2	20,3	10,4	16,6	13,4
6	Mineralgehalt / Gew.%	TGA	73,0	50,0	60,7	88,6	71,6	76,7
7	CO <sub>2</sub> -Verlust	TGA	23,1	16,1	19,1	36,0	27,3	29,7
8 (Gl. 3.5)	Ca <sup>2+</sup> : Mg <sup>2+</sup> = n : n		13,6	10,8	9,6	16,9	10,7	10,3
9 (Gl. 3.6)	Ca <sup>2+</sup> : Mg <sup>2+</sup> / Gew.%		22,7	17,6	15,94	28,07	17,58	16,88
10 (Gl. 3.7)	CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> : PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> = n : n		11,4	5,5	20,7	62,9	17,7	23,3
11 (Gl. 3.8)	CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> : PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> / Gew.%		7,2	3,5	12,8	40,9	11,0	14,7
12 (Gl. 3.9 aus 1)	n(Ca <sup>2+</sup> ) / mol		0,57	0,43	0,46	0,69	0,55	0,59
13 (Gl. 3.9 aus 2)	n(Mg <sup>2+</sup> ) / mol		0,04	0,04	0,05	0,04	0,05	0,06
14 (Gl. 3.9 aus 3)	n(PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> ) / mol		0,05	0,07	0,02	0,01	0,04	0,03
15 (Gl. 3.9 aus 7)	n(CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> ) / mol		0,53	0,37	0,43	0,82	0,62	0,68
16 (Gl. 3.10)	ε <sub>positive Ladungen</sub>		1,23	0,94	1,02	1,47	1,20	1,28
17 (Gl. 3.11)	ε <sub>negative Ladungen</sub>		1,19	0,93	0,93	1,68	1,35	1,44
18 (Gl. 3.12)	Ladungsbilanz		+0,04	+0,01	+0,09	-0,21	-0,15	-0,16

$$n = \frac{m}{M}; \quad \frac{m(\text{Ca}^{2+})}{M(\text{Ca}^{2+})} : \frac{m(\text{Mg}^{2+})}{M(\text{Mg}^{2+})} = n(\text{Ca}^{2+}) : n(\text{Mg}^{2+}) = x : 1 \quad (3.5)$$

$$\frac{m(\text{Ca}^{2+})}{m(\text{Mg}^{2+})} = x : 1 \quad (3.6)$$

$$\frac{m(\text{CO}_2)}{M(\text{CO}_2)} : \frac{m(\text{PO}_4^{3-})}{M(\text{PO}_4^{3-})} = n(\text{CO}_3^{2-}) : n(\text{PO}_4^{3-}) \quad (3.7)$$

$$m(\text{CO}_3^{2-}) = n(\text{CO}_3^{2-}) \cdot M(\text{CO}_3^{2-}); \quad \frac{m(\text{CO}_3^{2-})}{m(\text{PO}_4^{3-})} = x : 1 \quad (3.8)$$



$$n = \frac{m}{M} \quad (3.9)$$

$$\epsilon_{\text{positiv}} = (n(\text{Ca}^{2+}) + n(\text{Mg}^{2+})) \cdot 2 \quad (3.10)$$

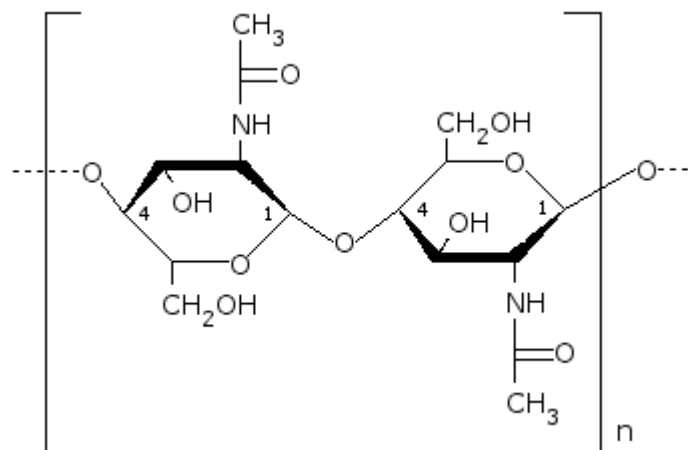
$$\epsilon_{\text{negativ}} = n(\text{PO}_4^{3-}) \cdot 3 + n(\text{CO}_3^{2-}) \cdot 2 \quad (3.11)$$

$$\text{Ladungsbilanz} = \epsilon_{\text{positiv}} - \epsilon_{\text{negativ}} \quad (3.12)$$

Der Finger des Taschenkrebses weist hingegen den geringsten Anteil an Wasser und organischer Matrix auf, was entsprechend zum höchsten Mineralanteil in Form von Calciumcarbonat führt. Generell zeigt sich, dass der Taschenkrebs im Vergleich zum Hummer weniger organisches Material und mehr Mineral in all seinen Panzerteilen enthält.

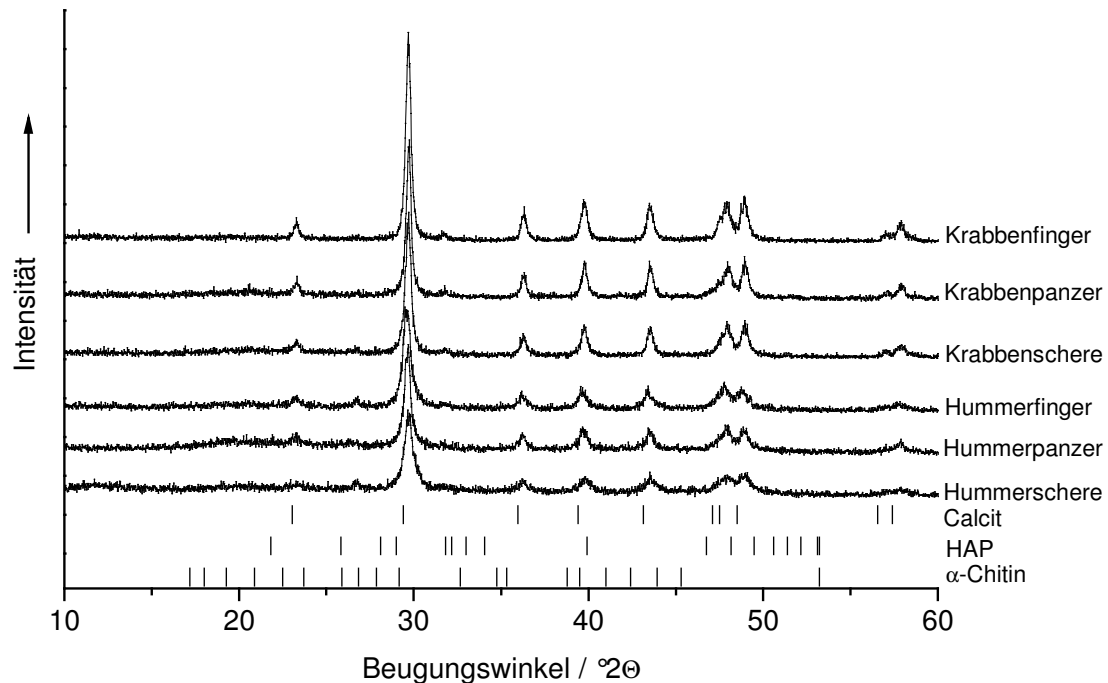
Die Analyse der Daten macht einen weiteren Unterschied zwischen den beiden Arten deutlich. Im Hummer verbleiben nach Auswertung aller Messungen positive Ladungen in den analysierten Schalteilen, wohingegen der Taschenkrebs einen Überschuss negativer Ionen ausweist, die nicht zu zuordnen sind. Die Ladungsbilanz des Hummerpanzers kann im Rahmen der Messgenauigkeit als ausgeglichen betrachtet werden.

Um mögliche weitere Stoffe in den Schalen zu identifizieren, die einen Ausgleich der in Tabelle 3.1.3 aufgeführten Ladungsbilanz ermöglichen, wurden Pulverdiffraktogramme vor und nach thermischer Behandlung (1100 °C) aufgenommen. Diese zeigen in beiden Crustaceenarten vor der thermischen Behandlung Calcit und  $\alpha$ -Chitin (Abb. 3.1.8).



**Abb. 3.1.8:** Ausschnitt aus der Molekülstruktur des in den Crustaceenschalen nachgewiesenen Chitins

Auffallend ist die Verbreiterung der Peaks, die auf nanopartikuläres Material hindeutet (Abb. 3.1.9). Mit Hilfe der Scherrer-Gleichung (s. Gl. 2.9) kann die Partikelgröße  $D_{hkl}$  abgeschätzt werden.



**Abb. 3.1.9:** Pulverdiffraktogramme der Pulver aus Taschenkrebs- und Hummerschalen vor der thermischen Behandlung.

Zwar ist ein Einfluss durch den Mahlvorgang in der Kugelmühle und die dabei auftretenden Kräfte und Temperaturen nicht auszuschließen, jedoch ist anzunehmen, dass die Partikel beim Mahlvorgang in ihre ursprünglichen Kristallite zerfallen. Zudem ist es möglich, dass amorphe Anteile in den Schalen durch die entstehende Reibungswärme kristallisieren und die Größe der Teilchen demnach eher zunehmen sollte. Die Abschätzung der Kristallitgröße ist demnach eine gute Näherung an die wirklich in den Tieren vorhandenen Kristallite.

Dazu wurden pro Probe zwei Reflexe ( $36,2^\circ 2\theta$  und  $43,5^\circ 2\theta$ ) vermessen, die keine Überlagerungen zwischen verschiedenen Phasen zeigten. Die Winkel entsprechen den hkl-Indizes (110) bei  $35,959^\circ 2\theta$  und (202) bei  $43,146^\circ 2\theta$ . Da jede Kurve einen Gauss- und einen Lorentzanteil besitzt, wurden die Reflexe mit beiden Anteilen gefittet und der Mittelwert gebildet. In Tabelle 3.1.4 sind die abgeschätzten Kristallitgrößen aller Probenpulver aufgeführt.

**Tab. 3.1.4:** Zusammenfassung der aus den Pulverdiffraktogrammen (Abb. 3.1.8) abgeschätzten Kristallitgrößen von Calcit der gemahlenen Hummer- und Taschenkrebsproben

Probe	Winkel / $^{\circ}2\Theta$ (hkl)	Halbwertbreite / $^{\circ}2\Theta$	Kristallitgröße $D_{hkl}$ / nm
Hummerfinger	36,21 (110)	0,54	18
	43,42 (202)	0,42	23
Hummerpanzer	36,23 (110)	0,41	23
	43,57 (202)	0,62	15
Hummerschere	36,24 (110)	0,39	19
	43,57 (202)	0,42	15
Taschenkrebsfinger	36,30 (110)	0,39	24
	43,53 (202)	0,42	23
Taschenkrebspanzer	36,30 (110)	0,38	26
	43,55 (202)	0,33	29
Taschenkrebsschere	36,28 (110)	0,41	23
	43,53 (202)	0,42	24

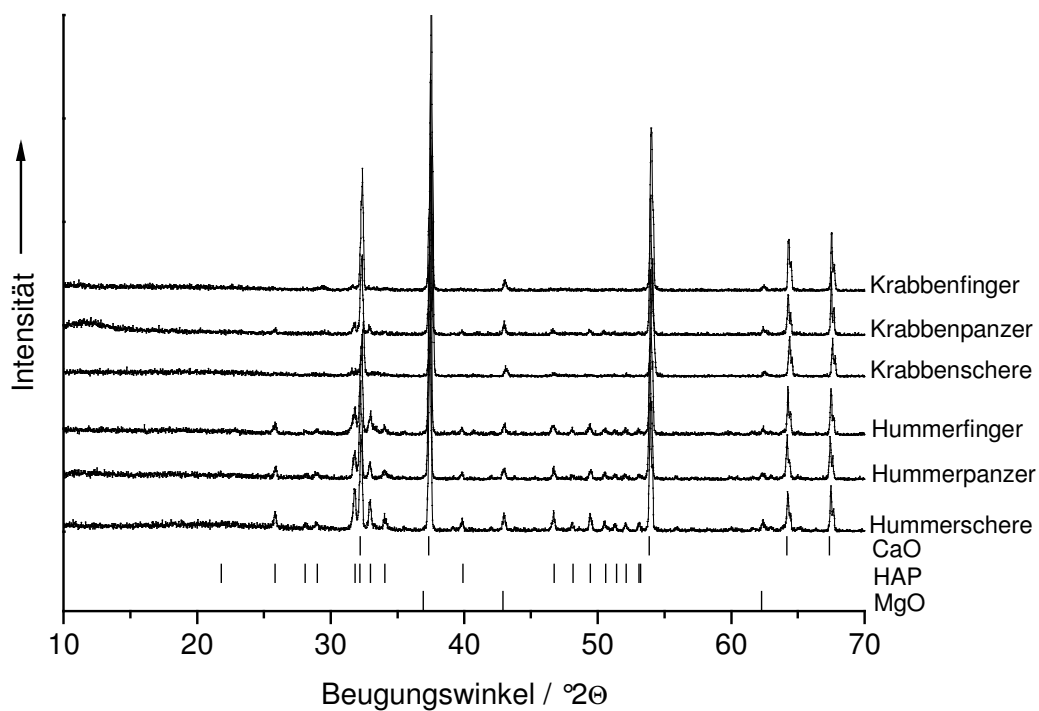
Es zeigt sich, dass die Partikeldurchmesser in den Schalen des Hummers im Durchschnitt um 19 nm liegen, wohingegen die Taschenkrebsschalen geringfügig größere Partikel (ca. 25 nm) aufweisen. Eine Anisotropie ist im Rahmen der Messgenauigkeit bei keiner Probe zu beobachten. REM-Aufnahmen der beiden Schalen zeigen im Hummer Partikelgrößen um 50 nm. Die Partikel in den Krebsschalen sind etwas größer, so dass die Ergebnisse gut mit der Abschätzung der Kristallitgröße übereinstimmen.

Nach dem Ausheizen bei 1100 °C finden sich in allen Schalenproben große Mengen an CaO und an MgO. Hydroxylapatit (HAP) ist ebenso in den Diffraktogrammen der Proben zu erkennen. Allerdings zeigen die Diffraktogramme der Schere und des Fingers des Taschenkrebses nur zwei sehr schwache Reflexe zwischen 30-35  $^{\circ}2\Theta$ , die darauf hindeuten, dass sich nur sehr geringe Mengen Hydroxylapatit in der Schale befinden (Abb. 3.1.10). Dies entspricht den Analysenergebnissen der UV-Spektroskopie, die dem Finger des Taschenkrebses den geringsten Phosphatanteil aller charakterisierten Proben zuordnet. Aus den MgO-Reflexen der Diffraktogramme nach thermischer Behandlung lässt sich ableiten, dass die als Calcit identifizierte Mineralphase ein Calcium-Magnesiumcarbonat sein muss. Zudem kann der Phosphorgehalt amorphem HAP zugeordnet werden, welches durch die Temperaturbehandlung kristallisiert. Bezieht man diese Ergebnisse in die Analysen aus Tabelle

3.1.3 ein, so ist ein Teil der fehlenden Anionen im Hummer rechnerisch mit den bisher unberücksichtigten  $\text{OH}^-$ -Ionen des Hydroxylapatits nach Gleichung 3.13 auszugleichen.

$$n(\text{OH}^-) = \frac{1}{3} n(\text{PO}_4^{3-}) \quad (3.13)$$

Berücksichtigt man diese negativen Ladungen in der Ladungsbilanz (überschüssige Ladungen) aus Tabelle 3.1.3, so erhält man die in Tabelle 3.1.5 aufgeführte neue Ladungsbilanz.



**Abb. 3.1.10:** Pulverdiffraktogramme der Taschenkrebs- und Hummerschalen nach thermischer Behandlung bei 1100 °C.

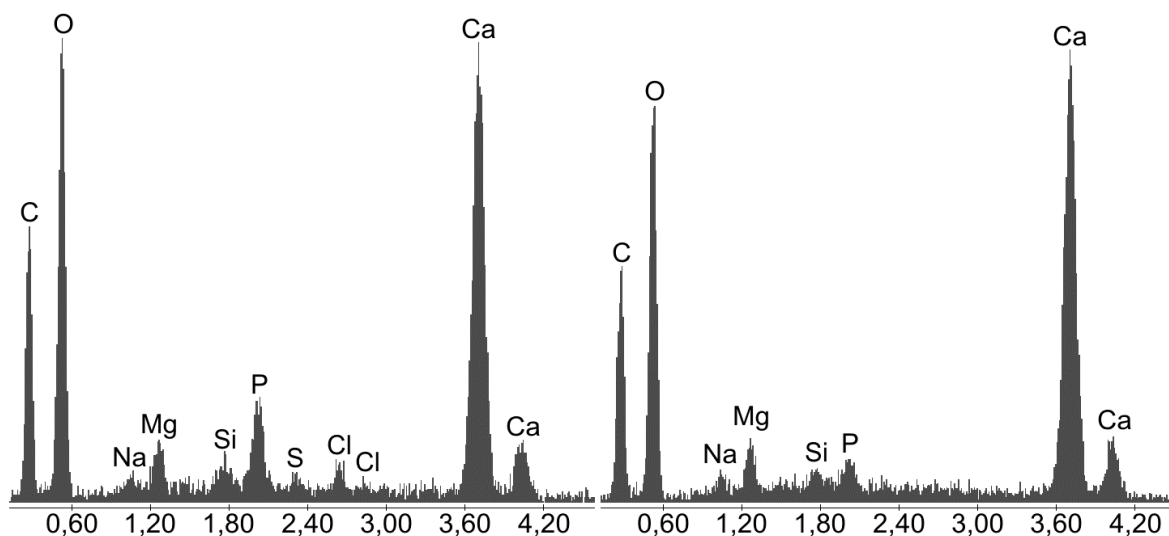
**Tab. 3.1.5:** Berechnung der verbleibenden Ladungen unter Berücksichtigung der  $\text{OH}^-$ -Ionen des in den Pulverdiffraktogrammen nachgewiesenen HAP

Ergebnis aus Tabelle 3.1.2	analysierter Wert	Hummer			Taschenkrebs		
		Finger	Panzer	Schere	Finger	Panzer	Schere
(14)	$n(\text{OH}^-)$ in HAP	0,02	0,02	0,01	0,003	0,01	0,01
(18)	überschüssige Ladungen	+0,04	+0,01	+0,09	-0,21	-0,15	-0,16
	Ladungsbilanz	+0,02	-0,01	+0,08	-0,21	-0,16	-0,17

Es zeigt sich, dass nur ein Teil der Ladungen in den Hummerschalen ausgeglichen werden kann. Werden die  $\text{OH}^-$ -Ionen des Hydroxylapatits in die Ladungsbilanz der Taschenkrebsschalen mit einbezogen, so erniedrigen sich die verbleibenden negativen Ladungen weiter in den negativen Bereich.

Das mittels UV-Spektroskopie nachgewiesene Phosphat muss nicht ausschließlich dem in der Pulverdiffraktometrie nachgewiesenen HAP zugeordnet werden, sondern kann möglicherweise ebenso aus geringen Mengen Hydrogenphosphat ( $\text{HPO}_4^{2-}$ ) stammen. Demzufolge wäre pro  $\text{HPO}_4^{2-}$ -Molekül eine positive Ladung vorhanden, die die negative Ladungsbilanz des Taschenkrebses zum Teil ausgleichen könnte. Problematisch ist, dass das möglicherweise vorhandene Hydrogenphosphat mit den verwendeten Methoden nicht nachweisbar ist.

Da die bisherigen Analysen keine weiteren Hinweise auf noch nicht identifizierte Substanzen der Schalenproben lieferten, sollten EDX-Analysen an den Pulvern der Schalenproben zeigen, welche Ionen in den untersuchten Crustaceen bisher unberücksichtigt blieben (Abb. 3.1.11).



**Abb. 3.1.11:** EDX-Spektren der durch Mahlen erhaltenen Pulver der Scheren von Hummer (links) und Taschenkrebs (rechts). Neben Calcium und Phosphat zeigen sich in beiden Spektren Natrium, Magnesium und Silicium. Im Hummer ist zusätzlich noch Chlor und ein geringer Anteil an Schwefel nachweisbar. Kohlenstoff und Sauerstoff sind sowohl dem Mineral als auch der organischen Phase zuzuordnen.

In allen Proben fanden sich wie erwartet Calcium, Magnesium, Kohlenstoff, Sauerstoff und Phosphor. Zusätzlich waren geringe Mengen Natrium zu finden. Bis auf den

Taschenkrebsfinger wiesen die Analysen aller anderen Proben Silicium auf. In den Hummerschalen als auch im Panzer des Taschenkrebses waren geringe Mengen Chlor vorhanden. Erstaunlich waren die zwar nur geringen, aber dennoch vorhandenen Mengen an Schwefel, die nur in den drei Hummerschalen nachweisbar waren.

In Tabelle 3.1.6 ist exemplarisch die quantitative Auswertung der in den EDX-Spektren aus Abbildung 3.1.11 gefundenen Atommengen in Atomprozent aufgeführt.

**Tab. 3.1.6:** Quantitative Auswertung der EDX-Spektren aus Abbildung 3.1.10

Element / Atom%	Hummerschere	Taschenkrebsschere
<b>Kohlenstoff</b>	36,14	31,65
<b>Sauerstoff</b>	47,79	52,06
<b>Natrium</b>	0,42	0,46
<b>Magnesium</b>	0,97	0,98
<b>Silicium</b>	0,49	0,34
<b>Phosphor</b>	1,54	0,58
<b>Schwefel</b>	0,29	-
<b>Chlor</b>	0,48	-
<b>Calcium</b>	11,87	13,93

Die Angaben können aufgrund der geringen Messgenauigkeit der Methode nur als Trend und nicht absolute Mengen angesehen werden. Die Mengen an Kohlenstoff und Sauerstoff beziehen sich nicht nur auf das vorhandene Mineral, sondern zusätzlich auf die organische Matrix.

Es ist anzunehmen, dass Natrium und Chlor von an der Oberfläche anhaftenden NaCl-Kristallen aus dem Wasser herrühren. In REM-Untersuchungen der Kooperationspartner konnten angewachsene Diatomeen auf der Schale nachgewiesen werden. Da die Crustaceenschalen vor der Untersuchung nur kurz mit Wasser gereinigt wurden, ist das Silicium vermutlich diesen Aufwüchsen zuzuschreiben.

Die Herkunft des Schwefels in den Hummerschalen kann nur vermutet werden. Es ist anzunehmen, dass schwefelhaltige Proteine in der organischen Matrix des Hummers vorliegen. Die organische Matrix der Hummerschalen müsste auf die hier vermuteten Proteine hin untersucht werden.

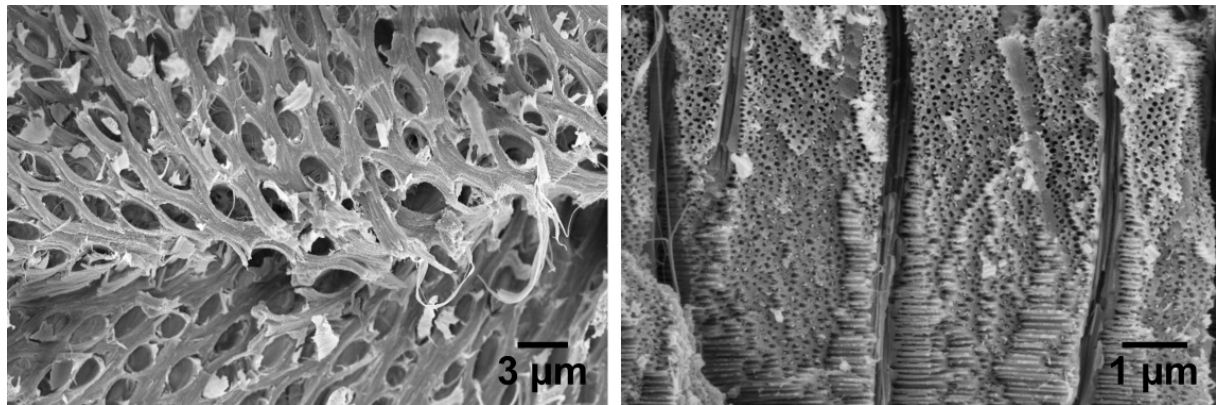
Aus den Analysen geht eindeutig hervor, dass in beiden Arten der Finger den höchsten Mineralgehalt aufweist, was mit dem niedrigsten Anteil organischen Materials einhergeht. Die Schere ist weniger stark mineralisiert, zeigt aber nur geringfügig

höhere Mengen organischen Materials. Das Greiforgan, das sich aus der Schere und dem Finger zusammensetzt, ist bedingt durch den hohen mineralischen Gehalt besonders stabil und eignet sich somit nicht nur zum Greifen und Festhalten von Nahrung, sondern auch zum Aufbrechen von Schalen anderer Lebewesen (Muscheln, Stachelhäuter), die als Nahrungsquelle dienen. Der Finger übt beim Öffnen von Schalen die größte Kraft aus, während die Schere nur den Gegendruck erzeugen muss. Entsprechend härter und unflexibel muss der Finger sein, was sich deutlich in den Untersuchungen zeigt.

Der Panzer ist bei beiden Tieren das am wenigsten mineralisierte Gewebe, welches deshalb den höchsten organischen Anteil aufweist. Die daraus resultierende Flexibilität kann bei Angriffen Schaden abhalten. Zusätzlich spart ein solches Kompositmaterial einen entscheidenden Anteil an Gewicht ein, das bei der Größe der Tiere im voll mineralisierten Zustand hinderlich wäre. Neben den unterschiedlichen Funktionen, die die einzelnen Schalen erfüllen müssen, spielt auch deren Größe im Verhältnis zur Gesamtgröße des Tieres eine Rolle für die Höhe des Mineralisationsgrades.

Deutlich treten die Unterschiede zwischen den beiden Spezies hervor. Der Hummer lebt im felsigen Wasser, wo er vor Fressfeinden zwischen den Steinen Schutz suchen kann und zudem schnell schwimmend flüchtet, weshalb sein gesamtes Exoskelett weniger stark mineralisiert ist. Die im Durchschnitt kleineren Kristallite sind sehr wahrscheinlich auf den deutlich höheren Anteil organischen Materials zurückzuführen. Der Taschenkrebs hingegen ist deutlich stärker mineralisiert und weist größere Kristallite auf. Da er sich von anderen Krebsen, Muscheln und Stachelhäutern ernährt, die er ausgräbt und fängt, ist seine Schere mit dem Finger besonders stark mineralisiert. Weil der Taschenkrebs nicht schwimmen und so nicht vor möglichen Feinden flüchten kann, ist sein Exoskelett deutlich stärker mineralisiert.

Die Untersuchung der Panzer beider Arten im REM zeigt diese strukturellen Unterschiede im Aufbau der Schalen (Abb. 3.1.12)<sup>[113]</sup>.



**Abb. 3.1.12:** REM-Aufnahmen des Hummerpanzers (links)<sup>[117]</sup> und des Panzers des Taschenkrebses (rechts). Die höhere Materialdichte im Panzer des Taschenkrebses ist deutlich zu erkennen (mit freundlicher Genehmigung von H. Fabritius).

Während der Hummer eine wenig mineralisierte großporige Struktur aufweist, ist der Panzer des Taschenkrebses deutlich stärker mineralisiert und feinporiger.

Die Untersuchungen zeigen, dass sich die Unterschiede in der Ernährung, aber auch im Verhalten und Lebensraum der Tiere deutlich in der Zusammensetzung ihres Exoskeletts widerspiegeln. Dennoch kann man trotz aller durchgeführten Untersuchungen keine Aussage über die genaue Zusammensetzung der Schalenteile machen. Hochauflösende Pulverdiffraktogramme mit anschließender Rietveld-Verfeinerung könnten Auskunft über mögliche amorphe Anteile in den untersuchten Schalen geben, die bereits in terrestrischen Isopoden<sup>[2, 76, 118]</sup> und der Krabbe *Pachygrapsus marmoratus*<sup>[13]</sup> nachgewiesen wurden. Anhand der vorliegenden Daten könnte zusammen mit diesen Analysen eine genaue Aussage über kristalline und amorphe Anteile in den untersuchten Schalen der Crustaceen gemacht werden.



### 3.1.2 Kristallisation in Gegenwart von Biofilmen und Biofilmbestandteilen

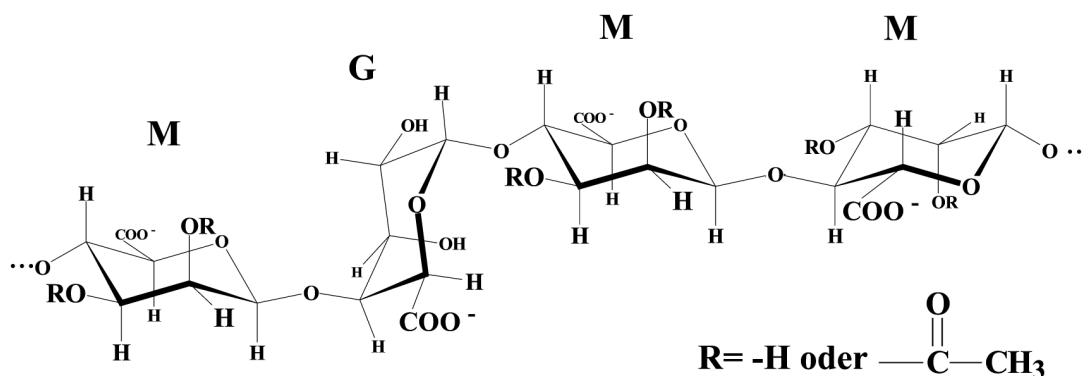
Lange Zeit blieb unbeachtet, dass der weit überwiegende Teil der Mikroorganismen in Biofilmen organisiert ist<sup>[119, 120]</sup>. Biofilme sind allgegenwärtig und auf Steinen, in Leitungsrohren, aber auch auf der Haut (Säureschutzmantel) zu finden. Dabei handelt es sich um Mikrokonsortien (Hydrogele, Schlämme, Flocken), in denen verschiedene Bakterien, aber auch Algen und Pilze leben können<sup>[121]</sup>. Ihnen dient der Biofilm durch seine starke Bindefähigkeit von Wasser<sup>[122]</sup> als Schutz vor Austrocknung, kann aber auch als Kommunikationsmedium mittels Botenstoffen genutzt werden und schafft durch seine dreidimensionale Struktur verschiedenste Lebensräume. In einem geschichteten Biofilm finden sich aerobe Bedingungen an der Oberfläche, die zur Substratfläche hin abnehmen und für Anaerobier einen Lebensraum bieten<sup>[123-125]</sup>. Die verbindende Matrix setzt sich zu einem hohen Prozentsatz aus verbrückten Polysacchariden zusammen, enthält daneben aber auch Proteine, Lipide, Nucleinsäuren und Botenstoffe. Sie werden mit dem Oberbegriff extrazelluläre polymere Substanzen (EPS) umschrieben, treten je nach Umweltbedingungen in unterschiedlichen Zusammensetzungen auf und bestimmen die mechanischen Eigenschaften der Filme<sup>[126-129]</sup>.

Obwohl die Wechselwirkungen der einzelnen Moleküle untereinander schwacher Natur sind, ist die Anzahl der möglichen Bindungsstellen für die hohe Stabilität dieser Filme verantwortlich.

Den Polysacchariden kommt in den Biofilmen eine große Bedeutung zu<sup>[130]</sup>, da sie nicht nur in großer Menge vorliegen, sondern auch mit ihren Eigenschaften zu den physikalischen Eigenschaften der Biofilme beitragen. Die Polysaccharide in Bakterien setzen sich aus den beiden Copolymeren der Uronsäuren  $\beta$ -D-Mannuronat (M) und  $\alpha$ -L-Guluronat zusammen (G). Entdeckt wurden sie erstmals 1881 von Stanford, der sie aus den Zellwänden von Braunalgen extrahierte und „Algin“ nannte<sup>[131, 132]</sup>. Daraus leitete sich im Laufe der Jahre die Bezeichnung Alginat ab. Es handelt sich um unverzweigte Kettenmoleküle, die aus alternierenden Mannuronat- und Guluronatmolekülen (M-G-Blöcke) aufgebaut sind, wobei auch homopolymere Bereiche (G-G- und MM-Blöcke) auftreten können. Im Unterschied zum Algalginat sind in Alginaten von Bakterien Teilbereiche acetyliert und es treten keine G-G-Blöcke auf<sup>[133, 134]</sup>. Die Acetylierung dient zum Schutz vor enzymatischem Abbau und bestimmt die physikalischen Eigenschaften der Alginat und letztendlich auch des Biofilms. Zusätzlich schwächt sie die Wechselwirkungen des Alginats mit divalenten

Kationen ab, so dass diese weniger anfällig für die Ausfällung sind. Die Bindung von Calcium ist dennoch hoch, weshalb die knäulförmigen Alginat von ihnen verbrückt werden und so die Stabilität der Biofilme zunimmt<sup>[129, 135]</sup>.

*Pseudomonas aeruginosa* (Schroeter 1872, Migula 1900) kommt ubiquitär in wässrigen bzw. feuchten Standorten sowohl in der Umwelt (Boden, Abwasser, Oberflächenwasser) als auch in technischen, wasserführenden Systemen vor. Seine Fähigkeit zur Ausbildung von Biofilmen führt dazu, dass es insbesondere an Oberflächen anwächst, die mit Wasser in Kontakt stehen. Es handelt sich um stäbchenförmige, Gram-negative Bakterien, die sich aerob von abgestorbenem organischen Material ernähren, aber auch anaerob durch Denitrifikation leben können. Sie sind zur Fortbewegung durch Flagellen befähigt und zum Teil mucoid (Schleimbildung innerhalb von 24 Stunden durch Überproduktion von Alginat)<sup>[136]</sup>. Da sie hochflexibel sind, können sie als opportunistische Krankheitserreger bei geschwächten Pflanzen oder Tieren auftreten und dort eine Reihe von Infektionen verursachen. Bei den Alginaten von *P. aeruginosa* SG81 sind die Kohlenstoffatome zwei und/oder die der Mannuronateinheiten teilweise acetyliert (Abb. 3.1.13).



**Abb. 3.1.13:** Struktur von Bakterienalginat. Die Mannuronateinheiten (M) können acetyliert vorliegen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Einfluss der Komponenten des Biofilms am Modellsystem von *P. aeruginosa* auf die Kristallisation von  $\text{CaCO}_3$  zu untersuchen. Im nachfolgenden Schritt sollte die Bildung von  $\text{CaCO}_3$  im lebenden Biofilm nachvollzogen werden. Letzteres kann Rückschlüsse auf mögliche biofilminduzierte Prozesse zur Gesteinsbildung geben.

### 3.1.2.1 Experimentelle Vorgehensweise

Die Kristallisation wurde mit Hilfe der Ammoniumcarbonatmethode (wie in der Literatur beschrieben<sup>[137-139]</sup>) in Anwesenheit der Additive (Alginat der Braunalge Manucol DM, Alginat von *P. aeruginosa* SG81, EPS von *P. aeruginosa*) in 1, 5 und 10 mmol  $\text{CaCl}_2$ -Lösung (1 mL) durchgeführt. Die Additive wurden in unterschiedlichen Konzentrationen von  $0,01 \text{ mg L}^{-1}$ ,  $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ ,  $1 \text{ mg L}^{-1}$ ,  $10 \text{ mg L}^{-1}$  und  $100 \text{ mg L}^{-1}$  den Kristallisationsansätzen zugegeben. Die in Schnappdeckelgefäßen befindliche Lösung wurden mit einer perforierten Aluminiumfolie ( $\varnothing = 0,45 \text{ mm}$ ) abgedeckt und in einem Exsikkator mit 3 g Ammoniumcarbonat mit Temperaturvariationen zwischen 30-50 °C für 24 Stunden aufbewahrt. In den Gefäßen befanden sich 8 x 8 mm große Glasplättchen, um Analysen der Präzipitate möglich zu machen. Bedingt durch die geringe Kristallausbeute waren weder XRD-Messungen noch IR-Analysen möglich, so dass eine rein morphologische Auswertung am REM vorgenommen wurde. Sowohl die Extraktion der Additive als auch die Kristallisationsversuche wurden anhand des mucoiden Bakterienstamms *P. aeruginosa* SG81 durchgeführt.

Die Kristallisationsversuche mit den Bakterienkulturen wurden ebenso in einem Exsikkator durchgeführt, der dazu mit  $\text{CO}_2$  geflutet wurde. Die Bakterien wurden mit etwa  $10^7$  Zellen über Membranfilter ( $\varnothing = 50 \text{ mm}$ , PALL, Gelman Sciences bzw.  $\varnothing = 47 \text{ mm}$  PALL, Life Sciences, Lot. 51487) abgesaugt. Die Filterpapiere wurden steril entnommen und anaerob auf PIA-(Pseudomonas-Isolierungs-Agar)-Platten mit 1 % Kaliumnitrat angezüchtet. Das Nitrat diente ihnen als Energiequelle. Um eine mögliche Kristallisation beobachten zu können, waren die PIA-Platten zudem mit null, zehn und hundert millimolarer  $\text{CaCl}_2$ -Lösung versetzt worden. Nach einem ( $\varnothing = 50 \text{ mm}$ ) bzw. drei ( $\varnothing = 47 \text{ mm}$ ) Tagen bei 36 °C wurden die bewachsenen Filter entnommen, über Phosphorpentoxid ( $\text{P}_2\text{O}_5$ ) zwei Tage getrocknet und im ESEM unbesputtert analysiert.

### 3.1.2.2 Ergebnisse und Diskussion

Die vorliegende Kristallisationsmethode wurde gewählt, um gleiche Kristallisationsbedingungen sowohl bei der Untersuchung des Einflusses der Additive auf die Kristallisation als auch bei der anschließenden Untersuchung der Mineralisation auf den Biofilmen zu gewährleisten. Die ausgewerteten REM-Bilder zeigten, dass

geringe Additivkonzentrationen unter  $1 \text{ mg L}^{-1}$  keinen Einfluss auf die Kristallisation im Vergleich zu den Kontrollen ausübten. Zugaben von  $1 \text{ mg L}^{-1}$  hingegen erhöhten die Anzahl und verringerten die Größe der Präzipitate im Vergleich zu den Kontroll-experimenten ohne Additiv. Besonders deutlich trat dieser Effekt bei den Proben, die mit Algenalginat versetzt wurden, auf. Dennoch war in diesen Proben noch kein eindeutiger Einfluss der Additive auf die Kristallmorphologie zu erkennen. Während alle Experimente mit einer Additivkonzentration von  $10 \text{ mg L}^{-1}$  wenige bis gar keine Kristalle aufwiesen und es auf eine Inhibition der Kristallisation hindeutete, war bei Additivkonzentrationen von  $100 \text{ mg L}^{-1}$  ein eindeutiger Effekt auf die Kristallmorphologie zu beobachten. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.1.7 im Bezug zur Kristallisationstemperatur zusammengefasst.

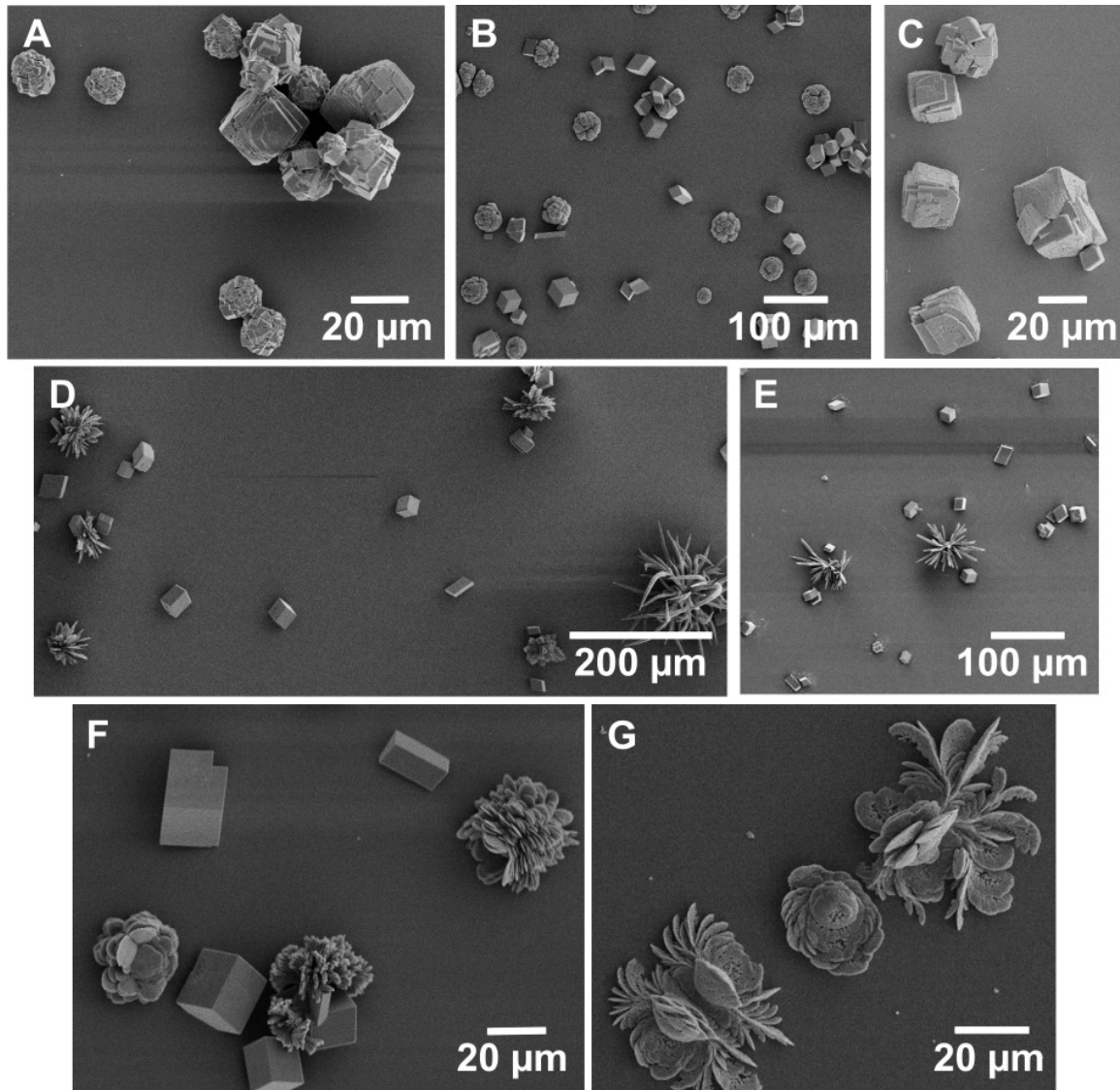
**Tab. 3.1.7:** Einfluss der Additive auf die Morphologien in den Kristallisationsexperimenten bei verschiedenen Temperaturen, einer Additivkonzentration von  $100 \text{ mg L}^{-1}$  und einem Calciumgehalt von  $5 \text{ mmol L}^{-1}$ .

Temperatur / °C Additiv	30	40	50
<b>Alginat der Braunalge</b>	zu Kugeln agglomerierte Calcitwürfel und vereinzelte Vateritkristalle		
<b>Alginat von <i>P. aeruginosa</i></b>	Calcit und Vaterit im Verhältnis 1:1	Abnahme des Vateritgehalts zu Gunsten von Calcit, ineinander verwachsene Calcite mit teils abgerundeten Ecken	
<b>EPS von <i>P. aeruginosa</i></b>	Calcit, Vaterit, teilweise Aragonit		Calcit und Vaterit; Vaterit mit verändertem Habitus
<b>Kontrolle ohne Additiv</b>	Calcit und Vaterit im Verhältnis 1:1, vereinzelt Aragonit		Calcit mit vereinzelt Aragonitkristallen

Die verwendeten  $\text{CaCl}_2$ -Lösungen mit einer Konzentration von einem, fünf und zehn Millimol pro Liter zeigten keinen Einfluss auf die Morphologie. Ihr Einfluss beschränkte sich auf die maximale Anzahl der auskristallisierenden Kristalle. Deshalb wurden die weiteren Versuche nur mit einer Konzentration von fünf Millimol pro Liter betrachtet.

In den Kontrollexperimenten konnten alle drei Polymorphe bei Temperaturen von 30 und 40 °C beobachtet werden (Abb. 3.1.14-D). Bei einer Temperatur von 50 °C fand sich hingegen nur noch Calcit mit vereinzelt Aragonitkristallen (Abb. 3.1.14-E). In Anwesenheit der EPS kristallisierten alle drei Polymorphe aus (Abb. 3.1.14-F). Nur die Zunahme der Temperatur verschob die bevorzugte polymorphe Phase hin zu Calcit und Vaterit. Einige der bei 50 °C gefundenen Vateritkristalle zeigten zudem einen veränderten Habitus (Abb. 3.1.14-G).

Das Verhältnis der Polymorphe untereinander schwankte zwischen den verschiedenen Versuchsansätzen mit EPS-Zugabe, so dass kein genaues Verhältnis der Polymorphe untereinander angegeben werden konnte.



**Abb. 3.1.14:** REM-Aufnahmen der  $\text{CaCO}_3$ -Kristallisationsprodukte, die in Anwesenheit von  $100 \text{ mg L}^{-1}$  Algenalginat (Mannucol DM) bei 30, 40 und 50 °C (A) entstanden. Die Kristallisation in Anwesenheit einer gleichen Konzentration von Bakterienalginat bei 30 °C (B) und 40 bzw. 50 °C (C) und ohne Additivzugabe bei 30 und 40 °C (D) bzw. 50 °C (E) als auch die Kristallisationsprodukte in Gegenwart von  $100 \text{ mg L}^{-1}$  EPS (F-G) sind exemplarisch dargestellt.

Das Bakterienalginat hingegen erleichterte die Kristallisation von Calcit und Vaterit (Abb. 3.1.14-B). Bei einer Temperatur von 40 °C nahm der Vateritgehalt zu Gunsten von Calcit ab. Dieser zeigte neben teilweise abgerundeten Ecken auch ineinander verwachsene Kristalle (Abb. 3.1.14-C). Besonders interessant waren die Kristallisations-

onsprodukte mit Mannucol DM (Algenalginat). Neben Vaterit kristallisierten vor allem Calcit rhomboeder aus, die zu Kugeln agglomeriert waren (Abb. 3.1.14-A). Sie ähneln den verwachsenen Calcit rhomboedern des Bakterienalginats, zeigen aber dennoch einen sehr viel runderen Habitus und deutlicher voneinander abgesetzte Calcit rhomboeder.

Die Kristallisationsergebnisse mit niedrigen Additivkonzentrationen wiesen darauf hin, dass diese die Keimbildung förderten. Höhere Konzentrationen zeigten einen deutlichen Einfluss auf die sich bildenden Polymorphe. Wie zu erwarten war, bildeten sich in Anwesenheit der EPS alle drei Polymorphe aus. Die EPS ist aus bisher nicht näher bestimmten Proteinen, Alginaten und anderen Bestandteilen zusammengesetzt, die je nach Wachstumsbedingungen des Biofilms schwanken können. Entsprechend wirken alle Additive des Gemischs auf die sich ausbildenden Kristalle ein und bilden so alle drei Polymorphe aus.

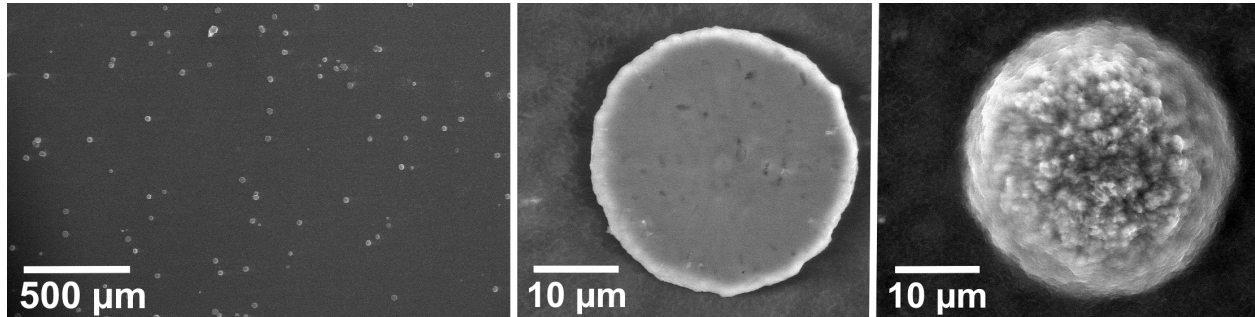
Da die Bestandteile in der EPS nicht gleichmäßig verteilt vorliegen, kann es beim Ansetzen verschiedener EPS-Lösungen zu unterschiedlichen Verteilungen gekommen sein. Damit wären die uneinheitlichen Verhältnisse der Polymorphe zueinander in den einzelnen Versuchen zu erklären.

Betrachtet man die Versuche mit Bakterienalginat, so erkennt man eine deutlich bevorzugte Kristallisation von Calcit mit Anteilen von Vaterit. Die ineinander kristallisierten Calcit rhomboeder deuten auf eine starke Calciumbindung durch die Alginatmoleküle hin. Die gleiche Verteilung tritt beim Algenalginat auf, bei dem die Calcit rhomboeder deutlich zu Kugeln agglomeriert waren. Beide Alginate fördern die Kristallisation des stabilsten Polymorphs Calcit. Die Bildung von Calcitkugeln und Calcitagglomeraten in beiden Alginaten ist auf die hohe Affinität der Alginatmoleküle divalente Kationen zu binden, zurückzuführen. Die Alginatmoleküle scheinen in einem zusammengeknäulten Zustand vorzuliegen, so dass sich die Calcit rhomboeder kugelförmig anordnen.

Die Versuche mit den Bakterienkulturen zeigten ferner, dass die Biofilme mit zunehmendem Calciumgehalt schlechter wuchsen.

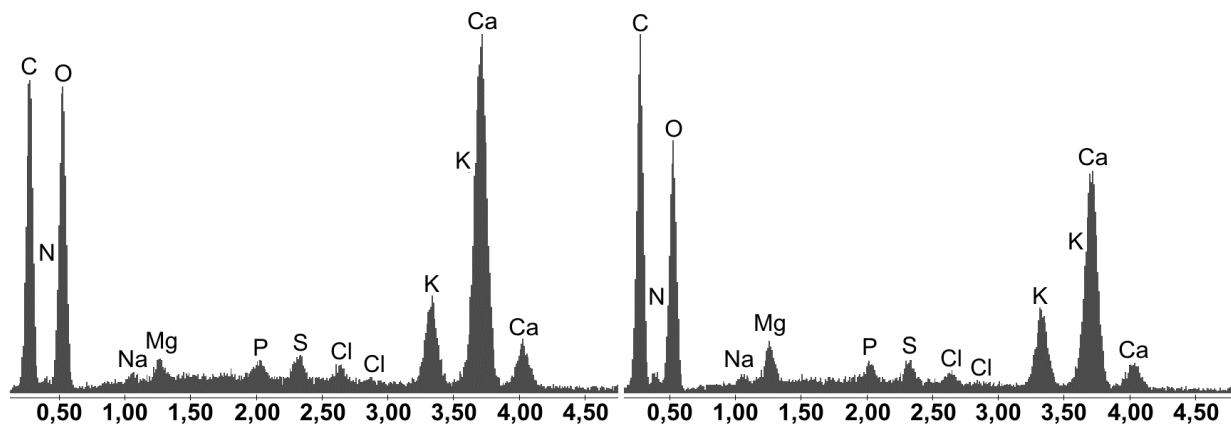
Eine Verlängerung der Inkubationszeit von zwei auf drei Tage brachte keine höhere Biofilmausbeute. Die Filme waren nach dieser Zeit sogar zum Teil schlechter angewachsen. Der Grund kann in der hohen Calciumkonzentration im Agar liegen, die sich zusätzlich durch die anaeroben Bedingungen negativ auf das Wachstum auswirkte.

Diejenigen Biofilme, die auf Platten wuchsen, welche mit 10 mmolarem  $\text{CaCl}_2$  versetzt waren, zeigten nach einem Tag Inkubationszeit in  $\text{CO}_2$ -haltiger Atmosphäre zwei verschiedene Morphologien mit etwa 20  $\mu\text{m}$  Durchmesser (Abb. 3.1.15).



**Abb. 3.1.15:** ESEM-Aufnahmen der Kristallisationsprodukte, die in hoch  $\text{CO}_2$ -haltiger Atmosphäre auf 10 mmolar  $\text{CaCl}_2$ -PIA-Platten innerhalb eines Tages auf dem Biofilm auskristallisiert waren. Die plättchenförmigen  $\text{CaCO}_3$ -Präzipitate (Mitte) weisen geringere Mengen Fremdionen als die halbkugelförmigen Präzipitate (rechts) auf.

Anhand von EDX-Spektren, die in Abbildung 3.1.16 dargestellt sind, konnten die Plättchen (Abb. 3.1.15 Mitte) als  $\text{CaCO}_3$  identifiziert werden, in das geringe Mengen Natrium, Magnesium und Kalium als auch Chlor, Phosphor und Schwefel eingebaut worden waren ( $\text{Ca}:\text{K} = 4,8$ ).



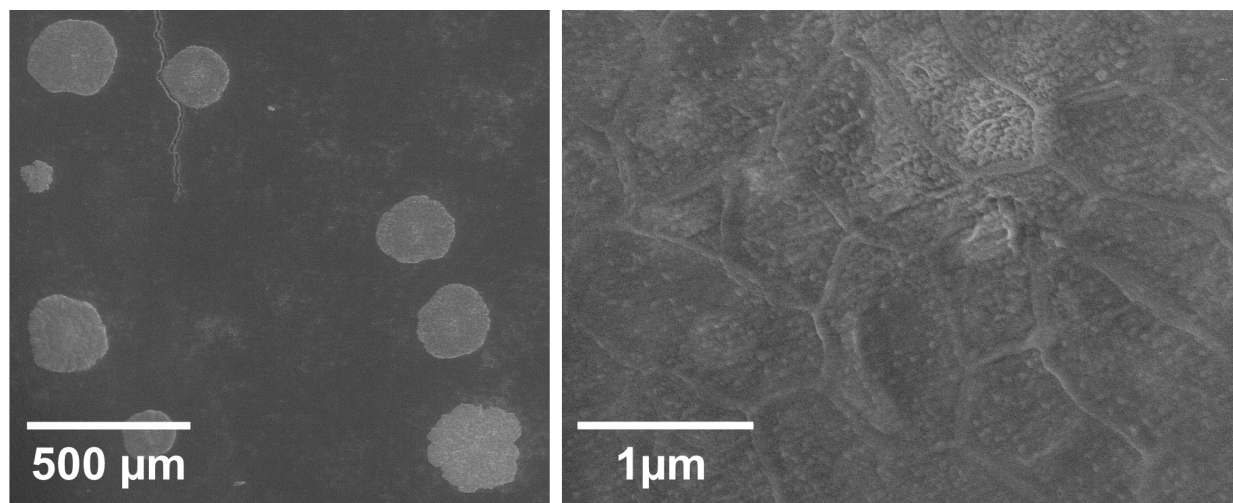
**Abb. 3.1.16:** EDX-Spektren der plättchenförmigen (links) und halbkugelförmigen Kristallisationsprodukte (rechts).

Die in geringeren Mengen vorhandenen, halbkugelförmigen  $\text{CaCO}_3$ -Aggregate (Abb. 3.1.15 rechts) konnten mit den EDX-Spektren ebenso als  $\text{CaCO}_3$  charakterisiert werden, in das höhere Menge an Kalium eingebaut worden war ( $\text{Ca}:\text{K} = 3,3$ ) (Tab. 3.1.8).

**Tab. 3.1.8:** Quantitative Analyse der Kristallisationsprodukte, die auf 10 mmolar  $\text{CaCl}_2$ -PIA-Platten innerhalb eines Tages auf dem Biofilm auskristallisiert sind

Element / Atom%	Plättchen	Halbkugel
Kohlenstoff	44,55	46,32
Stickstoff	6,10	9,78
Sauerstoff	41,14	35,04
Natrium	0,19	0,20
Magnesium	0,34	0,74
Phosphor	0,28	0,31
Schwefel	0,40	0,35
Chlor	0,25	0,21
Kalium	1,69	1,64
Calcium	8,07	5,41

Die Bakterien, die einen Tag auf 100 mmolaren  $\text{CaCl}_2$ -PIA-Platten inkubiert wurden, waren weniger dicht gewachsen, so dass noch die Gitternetzlinien des Filters durch den Biofilm zu sehen waren. Die dort zu beobachtenden Kristallisationsprodukte waren mit 200  $\mu\text{m}$  Durchmesser deutlich größer (Abb. 3.1.17). Zudem waren nur noch plättchenförmige Kristalle zu erkennen. Diese wiesen im EDX-Spektrum neben Calcium, Kohlenstoff und Sauerstoff einen sehr hohen Schwefelanteil auf. Im Vergleich zur Größe der Kristalle ist in Abbildung 3.1.17 zudem eine ESEM-Aufnahme des Bakterienfilms in höherer Vergrößerung gezeigt.

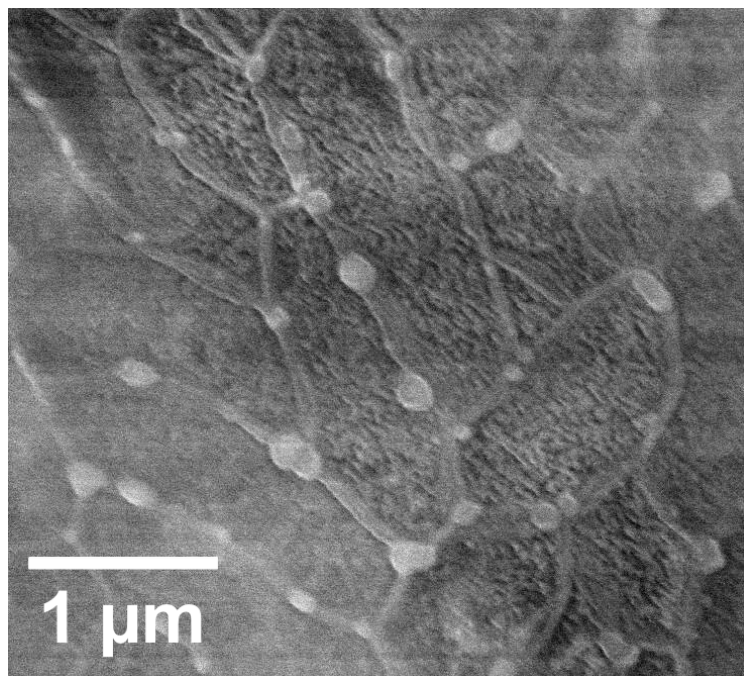


**Abb. 3.1.17:** ESEM-Aufnahmen der Kristallisationsprodukte, die in Anwesenheit von 100 mmol  $\text{CaCl}_2$  auf den Bakterien innerhalb eines Tages auskristallisiert waren (links) und des Bakterienrasens ohne Additivzugabe zum Größenvergleich (rechts).



Die Kontrollexperimente, in denen Bakterien ohne Calciumzugabe einen Tag in CO<sub>2</sub>-haltiger Atmosphäre angezogen wurden, zeigten keinerlei Kristallisation auf der Biofilmoberfläche. Weitere Kontrollexperimente, in denen nur die verwendeten Filterpapiere ohne Bakterien auf den Agarplatten auflagen, zeigten ebenso keine Kristallisationsprodukte. Es ist zu vermuten, dass die Filter ohne Bakterienbewuchs keine ausreichenden Kapillarkräfte ausbilden, um eine Kristallisation auf der Oberfläche zu ermöglichen.

Die Filter, welche drei Tage mit den Biofilmen inkubiert wurden, waren so dünn bewachsen, dass die auf den Filtern befindliche Gitterstruktur noch zu erkennen war. Sie enthielten zudem nur geringe Mengen Wasser, so dass sie innerhalb eines Tages über P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> trockneten und sich dabei wellten. Die Filter des 100 mmolaren CaCl<sub>2</sub>-Ansatzes ließen sich gar nicht mehr von der Petrischale lösen und mussten mit dem Skalpell in Stücken herausgeschnitten werden. Die wenigen Präzipitate (Abb. 3.1.18) waren in allen Ansätzen nachweisbar und enthielten laut EDX-Spektrum große Mengen Kalium, Kohlenstoff und Sauerstoff. Calcium war nur in sehr geringen Mengen zu finden. Außerdem traten sie immer dort auf, wo zwei Bakterien aneinander stießen.



**Abb. 3.1.18:** ESEM-Aufnahme der Trocknungsartefakte nach dreitägiger Inkubation ohne Calcium im Agar. Deutlich sind Präzipitate an den Zwischenräumen der Bakterien zu erkennen.

Es ist deshalb zu vermuten, dass es sich bei diesen Kristallisationsprodukten um Trocknungsartefakte handelt, die während des Trockenvorgangs zwischen den Bakterien auskristallisiert waren.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass in entsprechend hoher  $\text{CO}_2$ -Atmosphäre die Kristallisation von  $\text{CaCO}_3$  auf Biofilmen möglich ist. Allerdings konnten auf den Biofilmen nur flächige Strukturen kristallisiert werden, deren Phase nicht bestimmt werden konnte. In den Experimenten mit den zugesetzten Additiven kristallisierten hingegen alle Polymorphe des  $\text{CaCO}_3$ .

In wieweit die vorliegenden Versuche auf die Mineralisation von Biofilmoberflächen in der Natur übertragbar sind, ist bedingt durch den in den Versuchen eingesetzten hohen  $\text{CO}_2$ -Gehaltes fraglich. Zusätzlich scheinen Calciumkonzentrationen über 100 mmol in  $\text{CO}_2$ -reicher Atmosphäre die Ausbildung der Biofilme zu hemmen zumindest aber deren Wachstum zu verlangsamen.

Es zeigte sich allgemein, dass die Mineralisation auf Biofilmoberflächen möglich ist. Zudem dirigierte die Oberfläche des Biofilms die Kristallisation in Richtung flächiger Präzipitate. Die Untersuchungen des Einflusses in Lösung befindlicher Additive auf die Kristallisation von  $\text{CaCO}_3$  konnten nicht mit der Kristallisation auf den Biofilmen überein gebracht werden.

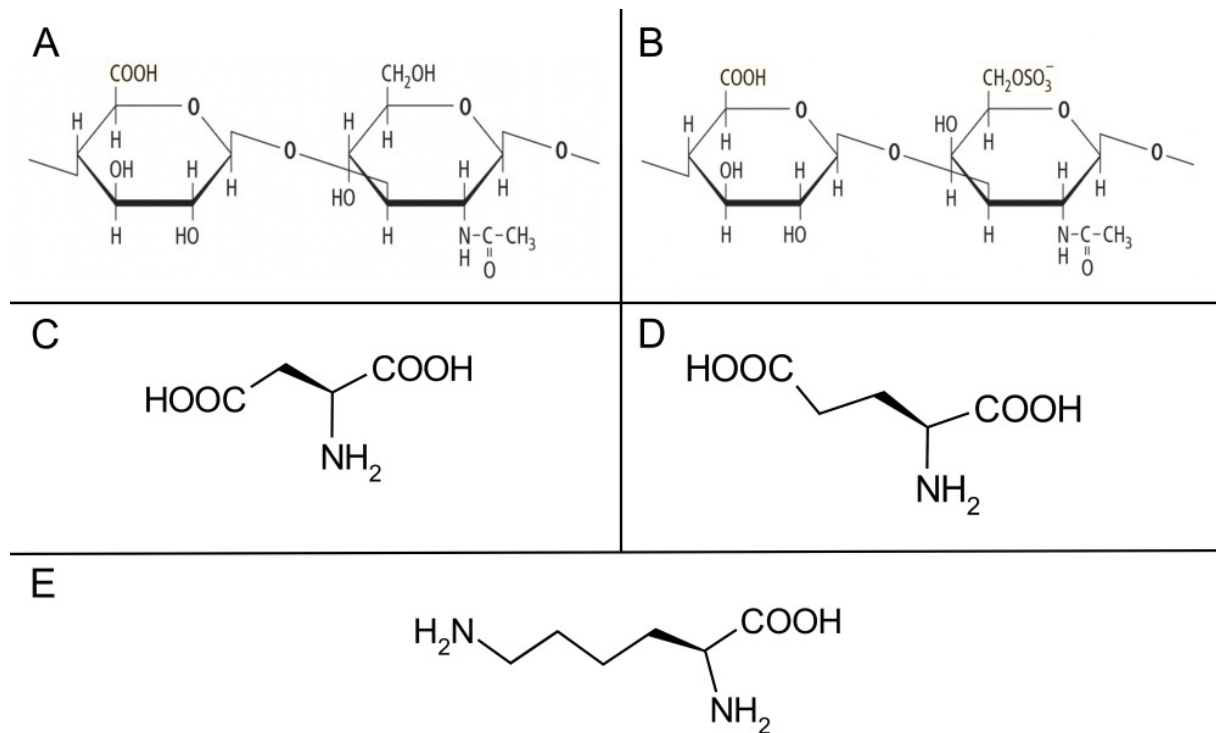
### 3.1.3 Kristallisation mit Hilfe der *Constant Composition Double Diffusion (CCDD)* Methode

In diesem Teil der Arbeit sollten Kristallisationsexperimente den Einfluss unterschiedlicher Komponenten simulieren, die in der organischen Matrix der Schneckenschale von *Biomphalaria glabrata* gefunden wurden. Die Schale dieser tropischen Süßwasserschnecke ist aus Aragonit aufgebaut, das in einer zweischichtigen Kreuzlamellenstruktur organisiert ist<sup>[140]</sup>. Die organische Matrix der Schale besteht sowohl aus verschiedenen Proteinen als auch aus Proteoglycanen (PG) und Glykosaminoglycanen (GAG)<sup>[140-142]</sup>. Sie setzt sich bezogen auf das Schalengewicht zu 1 Gew.% aus wasserunlöslichen und zu 0,03 Gew.% aus wasserlöslichen Bestandteilen zusammen. Ein prominentes Glycoprotein mit einer Größe von 19,6 kDa konnte aus dem wasserlöslichen Anteil isoliert und als Homologon des Dermato pontins identifiziert werden<sup>[143]</sup>. Neben den genannten Hauptbestandteilen enthält die Matrix noch beträchtliche Mengen an Sulfat, Neutral- und Aminosucker sowie geringe Mengen an Phosphat und Uronsäuren. Möglicherweise setzt sich der unlösliche Anteil der organischen Matrix aus den gleichen Substanzen in höheren Polymerisationsgraden zusammen.

Die Versuche zeigten, dass sowohl die wasserlösliche als auch die wasserunlösliche Matrix stark calciumbindend reagierte. In beiden Fraktionen konnten nur die GAGs und PGs als calciumbindende Komponenten identifiziert werden. Daraus kann gefolgert werden, dass das Dermato pontinhomologon als Strukturprotein zur räumlichen Anordnung der GAGs und PGs dient<sup>[142]</sup>.

Es konnten nur geringe Mengen organischer, wasserlöslicher Substanz aus den Schalen extrahiert werden, deren nachfolgende Reinigung in die Einzelkomponenten sich schwierig gestaltete. Anhand von käuflichen Additiven, die denen der organischen Matrix ähneln, sollte deshalb der Einfluss der Komponenten auf die Kristallisation von  $\text{CaCO}_3$  studiert werden.

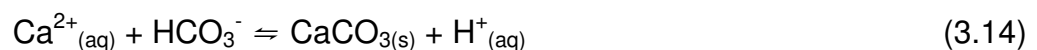
Stellvertretend für negativ geladene Teilbereiche der Proteine wurden Poly-L-Asparaginsäure und Poly-L-Glutaminsäure eingesetzt. Anhand von Poly-L-Lysin sollte den Einfluss positiv geladener, basischer Aminosäuren untersucht werden. Da Polysaccharide in Form von GAGs und PGs eine entscheidende Rolle bei der Calciumbindung spielen<sup>[142]</sup>, wurden Hyaluronsäure (250-50000 Disaccharideinheiten) und Chondroitinsulfat B (>100 Einheiten) als Vertreter negativ geladener Mischpolymere ebenfalls als Additive zugesetzt (Abb. 3.1.19).



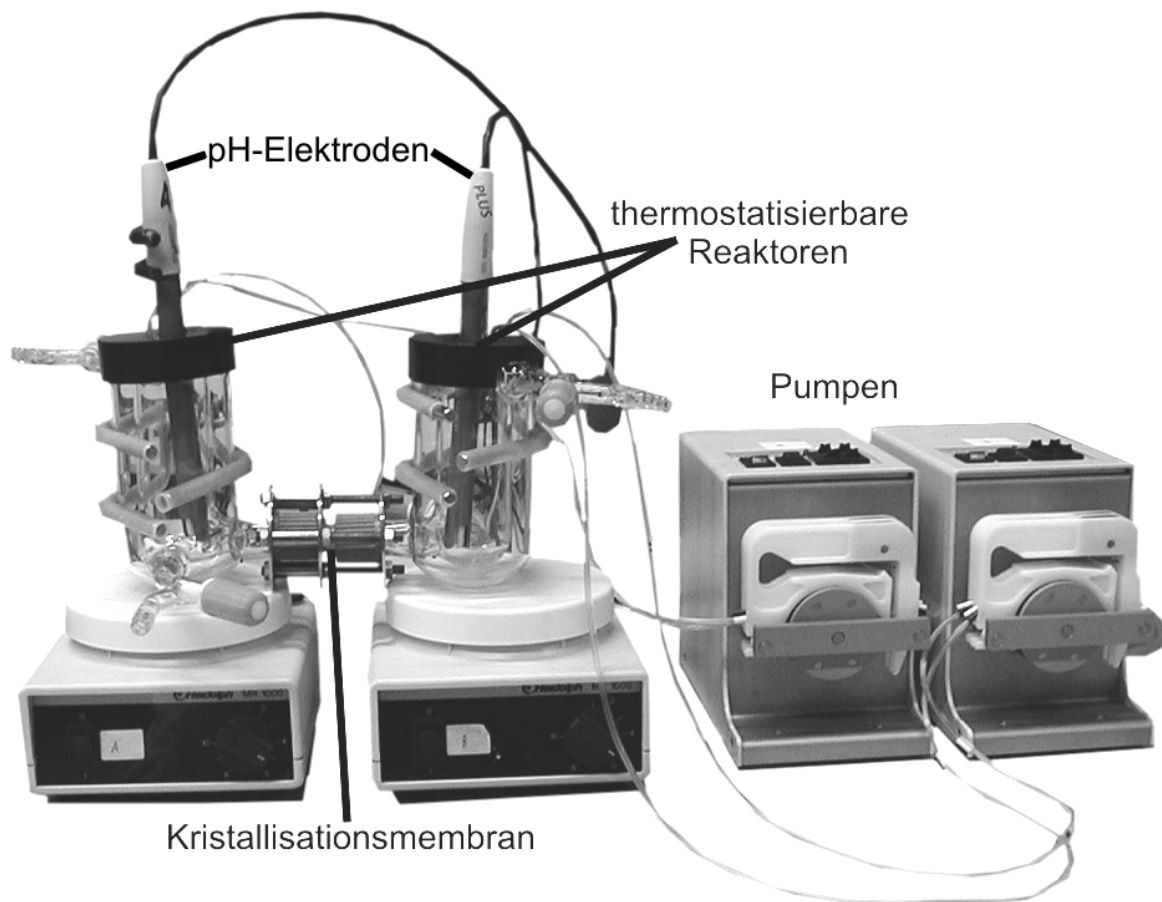
**Abb. 3.1.19:** Strukturformeln der verwendeten Additive. Hyaluronsäure (A) und Chondroitinsulfat (B) gehören zu den Glycosaminoglycanen. Die einzelnen Aminosäuren Asparaginsäure (C), Glutaminsäure (D) und Lysin (E) sind in den verwendeten Polyaminosäuremolekülen über Peptidbindungen miteinander verknüpft

Neben den herausgegriffenen Beispielsubstanzen wurden auch Versuche mit dem wasserlöslichen Anteil der organischen Matrix durchgeführt. Bedingt durch die geringen Mengen, die aus den Schneckenschalen als wasserlöslicher Anteil der organischen Matrix extrahiert werden konnten, wurde ebenso der aus undefinierten Mengen GAGs, PGs und Proteinen zusammengesetzte Schleimstoff Mucin als Additiv verwendet, da aufgrund früherer Untersuchungen sein IR-Spektrum dem der löslichen Schalenmatrix stark ähnelt<sup>[144]</sup>.

Die Versuche wurden in der von M. Eppele und F. Peters für Calciumphosphate<sup>[47]</sup> entwickelten und von A. Becker für  $\text{CaCO}_3$ <sup>[145]</sup> eingesetzten CCDD-Anlage durchgeführt. Die Anlage in Abbildung 3.1.20 zeigt zwei thermostatisierbare Kristallisationsgefäße, die über eine permeable Kristallisationsmembran miteinander verbunden sind. Fällt der pH-Wert während der Kristallisation (Gl. 3.14), so werden die Peristaltikpumpen über den Computer angesteuert.



Mit der Zugabe von NaOH-Lösung wird der pH-Wert ausgeglichen und dem System zeitgleich eine doppelt konzentrierte Stammlösung zugeführt. Damit soll verhindert werden, dass es durch den Ausgleich des pH-Wertes zu einer Verdünnung der Kristallisationslösungen kommt und zugleich dem Ionenverlust durch die Kristallisation entgegengewirkt werden. Die so gesteuerten Lösungen können mit einer Abweichung von  $\pm 0,02$  pH-Einheiten konstant gehalten werden.



**Abb. 3.1.20:** Abbildung der CCDD-Anlage. Zwischen den thermostatisierbaren Reaktionsgefäßen ist die Kristallisationsmembran eingespannt. Der pH-Wert wird in jedem Reaktionsgefäß verfolgt, im Computer (nicht im Bild) mit dem Sollwert verglichen und über die Zugabe von NaOH-Lösung konstant gehalten.

Zusammen mit den thermostatisierbaren Gefäßen und dem konstanten pH-Wert sollte dieser Aufbau natürlich ablaufenden Kristallisationsprozessen besonders nahe kommen können, da im Gegensatz zu anderen Kristallisationsmethoden (Kap. 2.2) alle variablen Parameter konstant gehalten werden. Zugleich können in der vorliegenden Anlage Auswirkungen von Additiven beobachtet werden, die in anderen

Methoden nicht sichtbar werden<sup>[34]</sup>. Da die Kristallisationsmembran mit je einer Seite sowohl zur Calcium- als auch zur Carbonatlösung hin ausgerichtet ist, kann der Einfluss der Additive in beiden Medien hinsichtlich der sie umgebenden Ionen untersucht werden.

#### 3.1.3.1 Experimentelle Vorgehensweise

Die Experimente wurden bei 27 °C mit Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>- und vergleichend mit Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>- bzw. CaCl<sub>2</sub>-Lösung einer Konzentration von je fünf Millimol pro Liter durchgeführt. Als Kristallisationsmatrix wurde die Dialysemembran Membra-Cell® (Nr. 44311, LOT 16335) von SERVA mit einem Rückhalt von Proteinen einer molekularen Masse von über 3500 Dalton verwendet. Der pH-Wert beider Lösungen wurde auf 9,30 voreingestellt und mit einer Schwankung von ±0,02 pH-Einheiten konstant gehalten. Die verwendeten Additive wurden direkt vor Überführung in die Anlage in Konzentrationen von 0,01 mg L<sup>-1</sup>, 0,1 mg L<sup>-1</sup> und 1 mg L<sup>-1</sup> in beide Kristallisationslösungen gegeben. Nach Versuchsende wurden die Schläuche der Peristaltikpumpen mit NaOH-Lösung und abschließend mit Reinstwasser gespült. Für jedes Additiv wurden neue Schläuche verwendet, um etwaige an den Schlauchwänden anheftende Rückstände nicht mit in die Kristallisationsapparatur einzubringen. Nach dreitägiger Versuchsdauer wurde die Kristallisationsmembran entnommen und zur Verhinderung von Trocknungsartefakten mit Ethanol abgespült. Die Kristallisationsprodukte wurden im Pulverdiffraktometer untersucht und im REM charakterisiert.

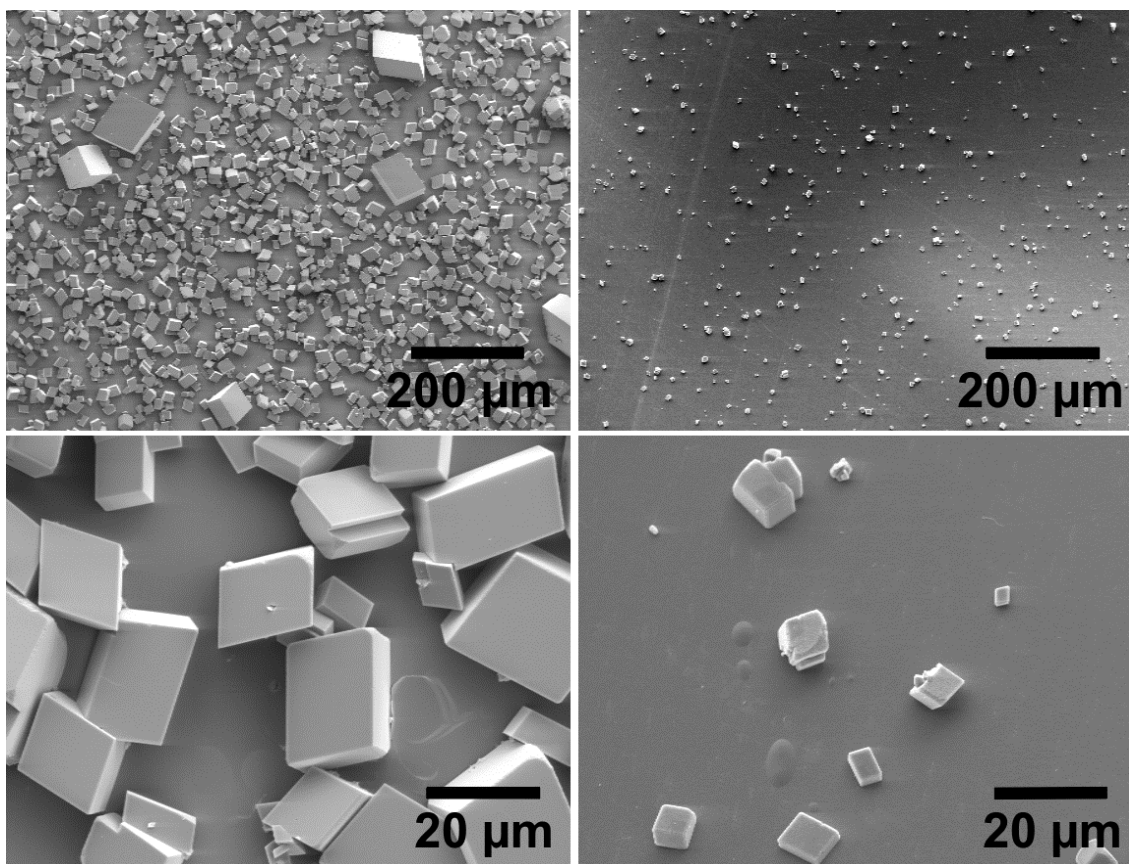
#### 3.1.3.2 Ergebnisse und Diskussion

Im Gegensatz zum Aufbau von A. Becker<sup>[13]</sup> wurden in der vorliegenden Arbeit Dialysemembranen als Kristallisationsmatrix genutzt. Diese weisen im Gegensatz zu den bisher verwendeten Filterpapieren eine höhere Reißfestigkeit und nur eine geringe Adsorption von Proteinen auf (< 2 ng mg<sup>-1</sup> Membran Trockengewicht). Nach einer dreitägigen Versuchsdauer konnte ein unterschiedliches Volumen in beiden Reaktionsgefäßen beobachtet werden. Die Volumina waren bei der Verwendung von Filterpapieren jedoch immer gleich, so dass anzunehmen ist, dass die semipermeable Membran nur einen diffusionsbedingten Austausch der beiden Flüssigkeiten zulässt. Die in der Vergangenheit verwendeten Filterpapiere waren aufgrund der Porengröße nicht für die Diffusion geeignet. Die bei Verwendung von Filterpapier

gleich bleibende Füllhöhe der Lösungen in beiden Gefäßen gibt eindeutige Hinweise auf einen auf Durchfluss basierenden Flüssigkeitsaustausch.

Die vergleichenden Untersuchungen zwischen den unterschiedlichen Anionen des eingesetzten Calciumsalzes ( $\text{Cl}^-$  bzw.  $\text{NO}_3^-$ ) zeigten keine Unterschiede in den sich ausbildenden Kristallen. Der Einfluss dieser Anionen auf die Kristallisation kann als gering eingestuft werden.

Bei einer Additivkonzentration von  $1 \text{ mg L}^{-1}$  war die Kristallisation von Calcit sowohl in Anwesenheit der Schneckenmatrix (Calcitrassen) als auch von Hyaluronsäure (einzelne Calcitkristalle) auf beiden Seiten der Membran zu beobachten (Abb. 3.1.21).



**Abb. 3.1.21:** REM-Aufnahmen der Kristalle, die bei einer Additivkonzentration von  $1 \text{ mg L}^{-1}$  der Schneckenmatrix (links) und Hyaluronsäure (rechts) kristallisiert wurden.

In Anwesenheit der Schneckenmatrix bildeten sich mit wenigen Ausnahmen etwa gleichgroße Calcitrhomboeder mit einer Größe von etwa  $20 \times 25 \text{ µm}$  mit perfekten Flächen und Kanten aus. Die Hyaluronsäure beeinflusste die Kristallisation des Calcits hingegen so, dass deutlich weniger und kleinere Kristalle von etwa  $10 \times 10 \text{ µm}$  entstanden.

**Tab. 3.1.9:** Ergebnisse der  $\text{CaCO}_3$ -Kristallisation in der CCDD-Anlage in Gegenwart verschiedener Additive bei einer Temperatur von 27 °C

Additiv	Konzentration / mg L <sup>-1</sup>	Kristallisation Ca-Seite	Kristallisation CO <sub>3</sub> -Seite
<b>Poly-L-Asparaginsäure</b>	1 (2x)	keine Kristallisation	keine Kristallisation
	0,1 (2x)	Vaterit und Calcit	keine Kristallisation
	0,01	Calcit, abgerundet, verwachsen	keine Kristallisation
	0,01	Calcit, löchriger Vaterit	Calcit, abgerundete Ecken
<b>Chondroitinsulfat</b>	1	keine Kristallisation	keine Kristallisation
	0,1	Calcit, einseitig abgerundet	Calcit, einige Vateritkristalle
	0,01	Calcit, abgerundete Ecken	Calcit, stufig
<b>Poly-L-Glutaminsäure</b>	1	keine Kristallisation	keine Kristallisation
	0,1	großer Calcit, wenig Vaterit	kleiner Calcit
	0,1	Calcit, abgerundete Ecken	Calcit, abgerundete Ecken
	0,01	zusammengewachsener Calcit, löchrige Strukturen	Calcit, abgerundete Ecken
	0,01	Calcitrasen	Aragonithanteln
<b>Hyaluronsäure</b>	1	winziger Calcit	winziger Calcit
	0,1	Vateritplättchen, vereinzelt Calcit	Calcit stufig
	0,01	Calcit, abgerundete Ecken	Calcit, abgerundete Ecken, verwachsen
	0,01	Calcit, stufig	keine Kristallisation
<b>Schneckenprotein</b>	1	Calcitrasen	Calcitrasen
	0,1	stark abgerundete Calcite	keine Kristallisation
	0,01	Calcit, abgerundete Ecken	Calcit und Vateritplättchen
<b>Mucin</b>	1	keine Kristallisation	keine Kristallisation
	1	Calcitteppich, stufig	Calcit
	0,1	Calcit und Vaterit	ballförmiger Calcit
	0,1	Calcit, abgerundete Ecken	keine Kristallisation
	0,01	Calcit, wenig Vaterit und Aragonit	Calcit, teils abgerundet
	0,01	Calcitteppich, abgerundet	Calcitteppich, wenig Aragonit
<b>Poly-L-Lysin</b>	1	keine Kristallisation	keine Kristallisation
	1	Calcitteppich, stufig	Calcit, vereinzelt Vaterit und Aragonit
	0,1	Calcit	Calcit, wenig Aragonit oder Vaterit
	0,1	wenig Calcit	keine Kristallisation
	0,01	kleiner Calcit, abgerundet und zusammengewachsen	großer und kleiner Calcit, stufig
	0,01	keine Kristallisation	keine Kristallisation



Diese wiesen zudem leicht abgerundete Kanten und Verwachsungen auf. Alle anderen eingesetzten Additive zeigten in dieser hohen Konzentration hingegen eine vollständige Inhibition auf beiden Seiten der Kristallisationsmembran.

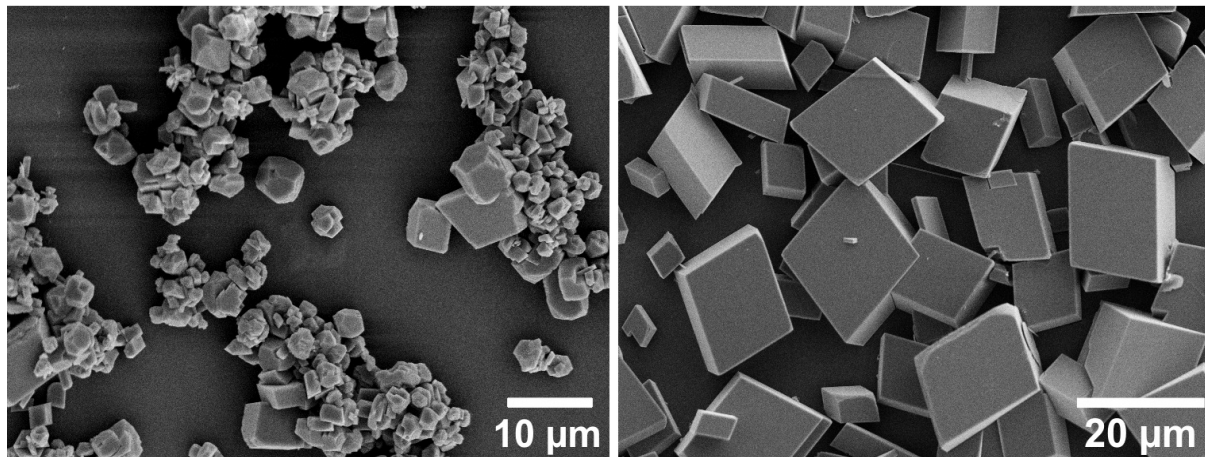
In Versuchen mit niedrigeren Additivkonzentrationen von 0,1 und 0,01 mg L<sup>-1</sup> konnten keine reproduzierbaren Ergebnisse erzielt werden. In Tabelle 3.1.9 sind die Ergebnisse der Kristallisationsexperimente in den unterschiedlichen Konzentrationen aller verwendeten Additive zusammengefasst.

Die Daten zeigen keinen Trend auf und können so nicht für weitere Betrachtungen herangezogen werden. Um die Reproduzierbarkeit der Anlage zu testen, wurden Versuche ohne Additivzugabe bei verschiedenen Temperaturen durchgeführt. Diese Versuche sollten zugleich helfen, die Anlage besser zu verstehen. Die Ergebnisse dieser Experimente sind in Tabelle 3.1.10 zusammengefasst.

**Tab. 3.1.10:** Kristallisationsergebnisse in der CCDD-Anlage bei verschiedenen Temperaturen und Versuchsansätzen auf beiden Seiten der Dialysemembran Membra-Cell®

Temperatur / °C	Kristallisation auf der Ca <sup>2+</sup> -Seite	Kristallisation auf der CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> -Seite
10	keine Kristallisation	keine Kristallisation
	keine Kristallisation	keine Kristallisation
20	abgerundete, verwachsene Calcitkristalle	große und kleine Calcitkristalle
	abgerundete, verwachsene Calcitkristalle	große und kleine Calcitkristalle
30	kleine Calcitkristalle, abgerundete Ecken	Teppich aus Calcit (groß und klein) und Vateritplättchen
	Calcitteppich, kleine Stufen, abgerundete Ecken	Calcitteppich, stufig, teils abgerundete Ecken
	Calcitkristalle, abgerundete Ecken	Calcit (groß und klein), Vateritplättchen, Aragonitkugeln mit eingewachsenen Calcitkristallen
40	große Vateritplatten, kleiner Calcit mit abgerundeten Ecken (fast rund)	Calcit, leicht stufig, vereinzelt Aragonit
	Calcitteppich, stufig	Calcitteppich, Aragonit und Vaterit, inverse Kanten
	Calcit- und Aragonitteppich	Vaterit, Aragonit und Calcit ineinander verwachsen

Während bei einer Versuchstemperatur von 10 °C in verschiedenen Ansätzen keine Kristallisation beobachtet werden konnte, zeigte eine Versuchstemperatur von 20 °C reproduzierbare Ergebnisse. Auf der Calciumseite kristallisierten ineinander verwachsene Calcite aus, deren Kanten abgerundet waren (Abb. 3.1.22 links). Die Carbonatseite wies hingegen größere perfekte Calcit rhomboeder auf (Abb. 3.1.22 rechts).



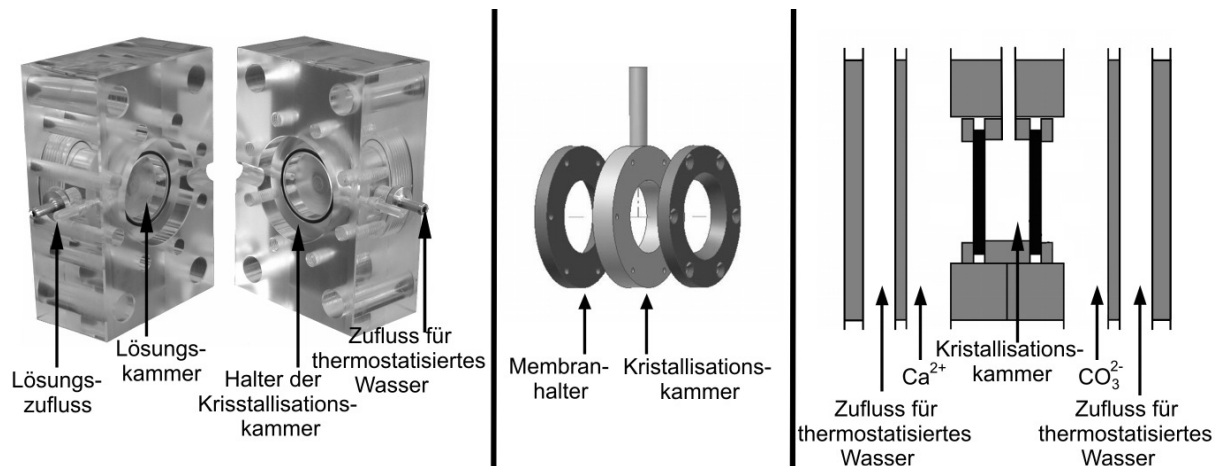
**Abb. 3.1.22:** REM-Aufnahmen der Kristallisationsergebnisse bei 20 °C ohne Additivzugabe auf der Calcium- (links) und Carbonatseite (rechts) der Dialysemembran.

Versuche bei Temperaturen von 30 ° und 40 °C zeigten keine reproduzierbaren Ergebnisse. Da in diesem Temperaturbereich die Kristallisation von Aragonit einsetzt, wurden in unterschiedlichen Ansätzen alle drei Polymorphe gefunden.

Die für den Einfluss der Additive verwendete Temperatur von 27 °C entspricht der Umgebungstemperatur, in der die tropische Süßwasserschnecke *Biomphalaria glabrata* lebt. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass der Temperatureinfluss den Einfluss der Additive überlagert. Die geringe Reproduzierbarkeit der Versuche mit Additiveinfluss ist infolgedessen erklärbar. Um die Anlage dennoch für die Untersuchung der Kristallisation in Gegenwart von Additiven einzusetzen, scheint es sinnvoll eine niedrigere Versuchstemperatur von 20 °C zu wählen. Nur die bei dieser Temperatur durchgeführten Versuche waren reproduzierbar. Niedrigere Temperaturen von 10 °C zeigten keinerlei Kristallisation auf den Membranen, so dass für die Versuche nur ein kleines Temperaturfenster um 20 °C zur Verfügung steht. Zudem scheint das System  $\text{CaCO}_3$  sehr störanfällig zu sein, da die Temperatureffekte diesen starken Einfluss auf die Kristallisation ausüben. Diesbezüglich muss der Einfluss der verwendeten Kristallisationsmembran in weiteren Versuchen ermittelt werden. Bereits A. P. Wheeler<sup>[146]</sup> konnte den großen Einfluss der Kristallisationsmatrix auf die Kristallisation von  $\text{CaCO}_3$  durch Experimente auf Glasoberflächen, entkalkten Krabbenpanzern und selbst (Zitat) „einfachem Einpackpapier von Käsescheiben“<sup>[146]</sup> aufzeigen. Eine andere Kristallisationsmatrix, die möglichst keinen Einfluss auf die Kristallisation ausübt, kann sich positiv auf die Stabilität des Systems auswirken und eine bessere Reproduzierbarkeit der Ergebnisse ermöglichen.

### 3.1.4 Test der Multi-Constant-Composition-Double-Diffusion (CCDD)-Anlage

Die von A. Becker entworfene Multi-Constant-Composition-Double-Diffusion-Anlage<sup>[13, 147]</sup> sollte systematisch hinsichtlich ihrer Funktion und Reproduzierbarkeit überprüft werden. Das vorliegende System unterscheidet sich grundlegend von der in Kapitel 3.1.3 beschriebenen CCDD-Anlage. Zwar wird auch hier der pH-Wert der Stammlösungen mit dem gleichen Programm konstant gehalten, jedoch stehen diese Lösungen nicht über eine Membran in direktem Kontakt zueinander, sondern sind durch zwei Membranen voneinander getrennt. Der Aufbau kommt einem Kompartiment gleich, welches von zwei verschiedenen Lösungen in turbulenter Strömung umströmt wird. Zusätzlich sind die Kristallisationskammern thermostatisierbar (Abb. 3.1.23).



**Abb. 3.1.23:** Darstellung der Multi-CCDD-Anlage. Das linke Photo zeigt die thermostatisierbare Halterung der Kristallisationskammer. In der technischen Zeichnung (Mitte) ist die Kristallisationskammer mit Befüllungsrohrchen dargestellt. Die Kristallisationsmembranen werden über die beiden äußeren Ringe an der Kammer befestigt. Rechts ist schematisch ein Schnitt durch den Gesamtaufbau gelegt worden. Die schwarzen Membranen begrenzen die Kammer.

Optimalerweise sollten die Ionen in der Kammer aufeinander treffen und in Lösung auskristallisieren. Die zusätzlich vorhandenen biologischen Additive können somit auf ihren Einfluss auf die Keimbildung und auf das Kristallwachstum untersucht werden. Da zeitgleich 12 Kammern mit gleichen Stammlösungen umflossen werden, sollte der Durchsatz erhöht und der direkte Vergleich verschiedener Additive unter gleichen Bedingungen untersucht werden. Ebenso verringert sich die für die Ansätze notwendige Menge an Additiv, da die Kammern ein maximales Volumen von 1 mL

fassen. Der Aufbau gewährleistet zudem eine kontinuierliche Diffusion in die Kristallisationskammer hinein, so dass auskristallisierte Ionen direkt ersetzt werden können.

#### 3.1.4.1 Experimentelle Vorgehensweise

Die Vorratsgefäße wurden mit je 50 L 5 mmol  $\text{CaCl}_2$ - bzw.  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ -Lösungen gefüllt. Der pH-Wert beider Lösungen wurde mit NaOH und HCl auf  $9,40 \pm 0,03$  eingestellt und per Computersteuerung konstant gehalten. Die für den Ausgleich des pH-Wertes notwendige NaOH-Lösung als auch die doppelt konzentrierten Stammlösungen zur Konstanthaltung der Konzentrationen (25 Liter  $10 \text{ mmol L}^{-1}$   $\text{CaCl}_2$ - bzw.  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ -Lösungen und 20 Liter 0,1 molare NaOH) waren über die computergesteuerten Pumpen mit den Vorratsgefäßen verbunden. Wie auch schon bei der CCDD-Anlage wird bei einem Abfall des pH-Wertes unter einen gesetzten Schwellenwert NaOH-Lösung zugegeben, um diesen wieder auszugleichen. Die zusätzlich zugegebenen doppelt konzentrierten Stammlösungen sollen verhindern, dass die Zugabe der NaOH-Lösung die Vorratslösungen verdünnt. Die Anlage wurde mit verschiedenen Membranen, Temperaturen (10-40 °C) als auch verschiedenen Lösungen in den Kammern systematisch untersucht.

#### 3.1.4.2 Ergebnisse und Diskussion

Erste Versuche mit Reinstwasser in der Kammer wurden mit den bereits in Kapitel 3.1.3 verwendeten Dialysemembranen (Membra-Cell<sup>®</sup>) durchgeführt. In den Kristallisationskammern war nach Versuchsende anstelle von einem Milliliter nur noch ca. 750  $\mu\text{L}$  Lösung vorhanden und die Membranen wölbten sich beidseitig leicht in die Kammer. Zudem fanden sich nur auf der der Carbonatlösung zugewandten Seite der Membran Kristallisationsprodukte. Der osmotische Druck  $p$  zu beiden Seiten der Membran beträgt bei einer Temperatur  $T$  von 293,15 K nach Gleichung 3.15 etwa  $1,22 \cdot 10^4 \text{ Pa}$ .

$$p_{\text{Osmose}} = [A] \cdot R \cdot T \quad (3.15)$$

Er ist abhängig von der Umgebungstemperatur, der Ionenkonzentration der Lösung an der Membran  $[A]$ .  $R$  bezeichnet die allgemeine Gaskonstante. Der berechnete Druck ist aufgrund der niedrigen Lösungskonzentration von  $5 \text{ mmol L}^{-1}$  sehr gering. Da es sich nicht um ein abgeschlossenes System handelt, kann es zu keinem Kon-

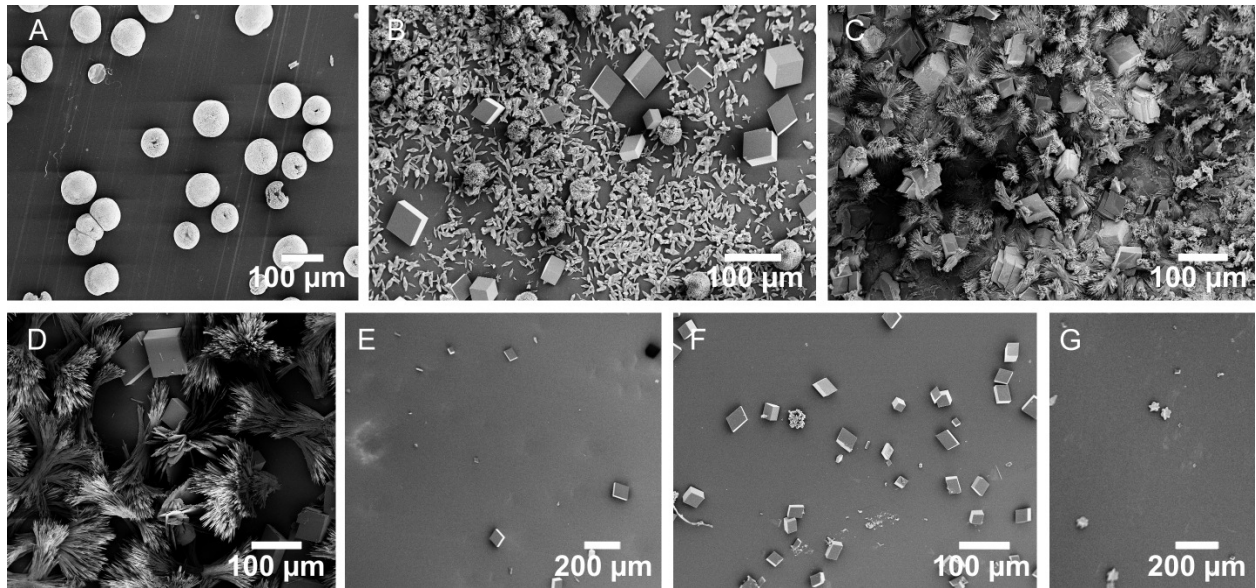
zentrationausgleich zwischen der vorbeiströmenden Flüssigkeit und der innerhalb der Kristallisationskammer kommen. Es diffundiert ein größerer Anteil an Wassermolekülen in die vorbeiströmenden Lösungen als aus diesen wieder zurückdiffundieren kann. Dies führt zu einer Volumenabnahme, die zu einem Einwölben der Membranen in die Kristallisationskammer führt.

Um die Diffusionsgeschwindigkeit zwischen den beiden Membranen zu erhöhen, wurden die Versuche mit steigenden Temperaturen durchgeführt. In Tabelle 3.1.11 sind die Ergebnisse zusammengestellt.

**Tab. 3.1.11:** Ergebnisse der Kristallisation von  $\text{CaCO}_3$  in der Multi-CCDD-Anlage bei verschiedenen Temperaturen mit der Dialysemembran Membra-Cell® bei Betrachtung der einzelnen Membranseiten

Temperatur / °C	10	20	30	40
<b><math>\text{CO}_3^{2-}</math>- Außenseite</b>	Vateritkugeln, vereinzelt Aragonitkugeln	Aragonit, Vaterit und/ oder Calcit	Aragonit- und Calcitrasen	große Aragonit- und Calcitkristalle
<b><math>\text{CO}_3^{2-}</math>- Innenseite und <math>\text{Ca}^{2+}</math>-Innen- und Außenseite</b>	keine Kristallisation	keine Kristallisation	vereinzelte kleine Calcitkristalle	$\text{CO}_3^{2-}$ -innen: kleine Calcite $\text{Ca}^{2+}$ -außen: Calcit und Aragonit $\text{Ca}^{2+}$ -innen : Calcit und Vaterit

Die zugehörigen REM-Aufnahmen zeigt Abbildung 3.1.24. Die Ergebnisse zeigten, dass trotz steigender Temperatur keine vermehrte Kristallisation auf den Innenseiten der Kristallisationskammer oder der  $\text{Ca}^{2+}$ -Außenseite auftrat. Um den Einfluss der Additive auf die Kristallisation untersuchen zu können, ist eine ausreichend hohe Anzahl an Kristallen auf den Innenseiten notwendig. Die Zahl der bei Temperaturen von 30 ° und 40 °C beobachteten Kristalle auf diesen Seiten lag bei ca. 20 Kristallen. Für aussagekräftige Untersuchungen des Einflusses der Additive war diese Zahl zu gering. Es ist zu vermuten, dass nicht hinreichend viele Ionen über die Membranen in die Kristallisationskammer diffundierten. Um diesem Problem Abhilfe zu verschaffen, wurde das in der Kristallisationskammer befindliche Reinstwasser gegen verschiedene wässrige Lösungen ausgetauscht und die Kristallisationsprodukte untersucht.



**Abb. 3.1.24:** REM-Aufnahmen der Kristallisationsprodukte in der Multi-CCDD-Anlage bei verschiedenen Temperaturen auf der Dialysemembran Membra-Cell®. A-D zeigt die  $\text{CO}_3^{2-}$ -Außenseite. Bei einer Temperatur von 10 °C kristallisieren Vateritkugeln aus (A). Bei 20 °C sind Aragonit- und Calcitkristalle zu finden (B), während sich bei 30 °C ein Rasen aus Aragonit- und Calcitkristallen ausbildet. Einzelne große Calcit- und Aragonitkristalle sind bei 40 °C zu finden. E zeigt die Carbonatinnenseite bei 40 °C mit vereinzelt kleinen Calcitkristallen. Die Calciuminnen- (F) und außenseite (G) zeigten bei 40 °C Calcitkristalle mit Spuren von Aragonit (F) oder Vaterit (G).

Um den Konzentrationsunterschied zwischen den vorbeiströmenden Lösungen und der Lösung innerhalb der Kristallisationskammer zu verringern, wurden Versuche mit den Gegenionen der für den Ansatz der Lösungen verwendeten Salze durchgeführt. Die Versuche mit 5 mmolarer NaCl-Lösung zeigten keine Veränderung der Kristallisation auf den einzelnen Membranseiten, so dass gesättigte  $\text{CaCO}_3$ -Lösungen in die Kristallisationskammer gefüllt wurden. In diesen Versuchen war nur eine geringfügig höhere Kristallisation auf beiden Seiten der Calciumlösung zu erkennen. Es konnte keine Veränderung auf der Carbonatinnenseite beobachtet werden.

Die Versuche ließen den Schluss zu, dass die Diffusion der Carbonationen behindert wurde. Die Abschätzungen der Ionenradien mit umgebenden Hydrathüllen zeigten keine nennenswerten Unterschiede zwischen den hydratisierten Calciumionen und den hydratisierten Carbonationen. Das Calcium ist mit seiner umgebenden Hydrathülle mit einem Radius von 0,31 nm sogar etwas größer als das hydratisierte Hydrogencarbonatanion mit einem Radius von 0,21 nm. Es ist anzunehmen, dass die verwendete Dialysemembran, die aus regenerierter Cellulose aufgebaut ist, unter

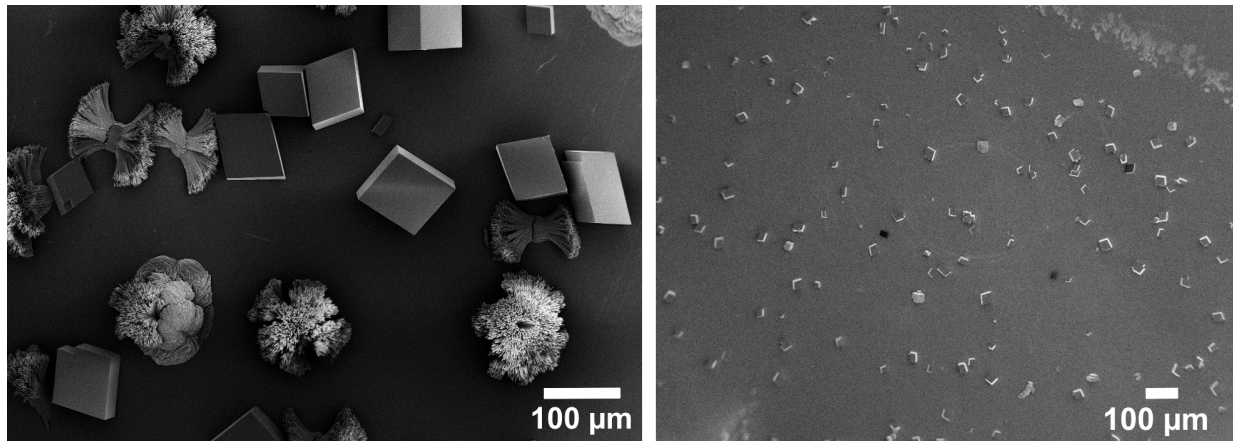
den gegebenen Bedingungen in wässriger Lösung negativ geladen ist und somit die Diffusion der Carbonationen behindert.

Die Versuche zeigten, dass die Membran einen entscheidenden Einfluss auf die Kristallisation ausübte. Dass die verwendete Kristallisationsoberfläche einen entscheidenden Einfluss auf die Kristallisation ausübt, wurde bereits von A. P. Wheeler beschrieben<sup>[146]</sup>. Um eine Präzipitation in der Kristallisationskammer zu ermöglichen, wurden weitere Membranen getestet. In Tabelle 3.1.12 sind die untersuchten Membrantypen mit den Kristallisationsergebnissen zusammengetragen.

**Tab. 3.1.12:** Ergebnisse der Multi-CCDD-Anlage mit verschiedenen Kristallisationsmembranen bei 20 °C und Reinstwasser in den Kammern

Membrantyp	Dialysemembran Nadir®	Ultrafiltrationsmembran OMEGA™	Nitrocellulosemembran	Immobilon-P
Hersteller	Carl Roth GmbH	PALL Life science	Pharmacia LKB	Millipore
Material	regenerierte Cellulose	Polyethersulfon	Nitrocellulose, protein-adsorbierend	PVDF (Polyvinylidenfluorid), protein-adsorbierend
Porengröße	10-20 kDa	10 kDa	0,2 & 0,45 µm	0,45 µm
Ergebnis	Kristallisation nur auf der CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> -Außenseite	Kammer lief leer	Kammer lief leer	Kammer lief leer

Die untersuchte Dialysemembran Nadir® zeigte trotz deutlich größerem Porendurchmesser keine Kristallisation auf den Membraninnenseiten. Die auf der Carbonat-außenseite entstehenden Kristalle waren etwas größer als vergleichbare Kristallisationsprodukte auf der Dialysemembran von Membra-Cell®. Es kristallisierten allerdings ebenso Calcit und Aragonit mit geringen Mengen Vaterit aus. Zusätzlich waren in einem Fall kleine Calcitkristalle auf der Calciumaußenseite zu sehen (Abb. 3.1.25). Die Membranen und ihr Einfluss auf die Kristallisation können somit trotz ihrer unterschiedlichen Porengröße miteinander verglichen werden. Diese Ergebnisse bestätigen die Annahme, dass die Membranen im wässrigen Milieu negativ geladen waren und so die Diffusion von Carbonationen behindert wurde.



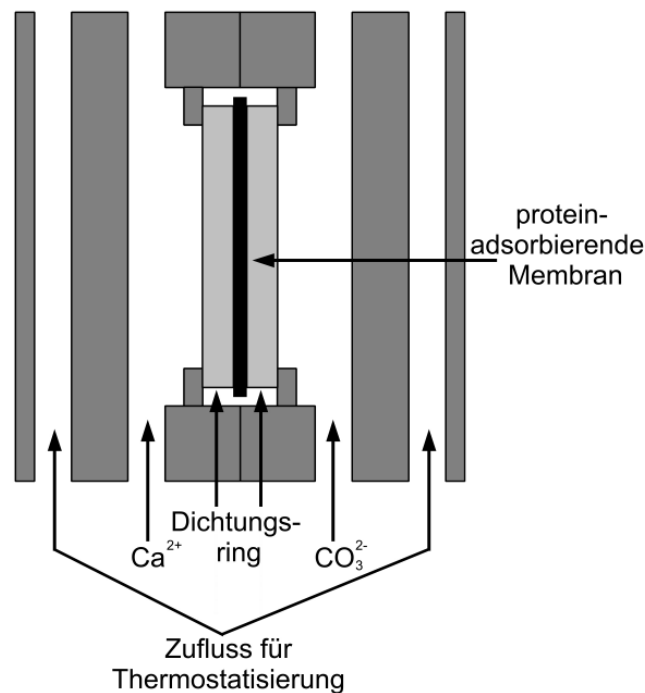
**Abb. 3.1.25:** REM-Aufnahme der Kristallisationsprodukte auf der Carbonataußenseite (links) und die in einem Fall erhaltenen Kristalle auf der Calciumaußenseite (rechts) der Dialysemembran Nadir® bei einer Temperatur von 20 °C.

Die Suche nach weiteren Membranen gestaltete sich als schwierig, da die Membran selbst möglichst keinen Einfluss auf die diffundierenden Ionen ausüben sollte. Der Porendurchmesser durfte nicht mehr als  $\sim 2\text{-}4\text{ nm}$  betragen, da ansonsten die verwendeten Additive aus der Kristallisationskammer diffundiert wären. In den Versuchen mit der in Frage kommenden Ultrafiltrationsmembran konnte keine Kristallisation beobachtet werden. Die Membran war aus einem Cellulosefilter aufgebaut, auf das einseitig eine Polyethersulfonschicht aufgebracht worden war. Die Kammern liefen trotz geringem Porendurchmessers unabhängig von der Ausrichtung der Membranseiten leer. Bei diesen Membranen handelte es sich um Ultrafiltrationsmembranen. Da dieser Membrantyp für die Reinigung von Flüssigkeiten konstruiert wurde, besitzt er einen Aufbau, der die Flüssigkeiten in einer Vorzugsrichtung, nämlich der des fließenden Systems hin abführt. In Experimenten mit verschiedenen Membranausrichtungen zeigte sich allerdings, dass in jeder Ausrichtung eine Diffusion über die Membran in Richtung des abfließenden Systems hin auftrat.

Desweiteren wurden proteinadsorbierende Membranen getestet, die ebenso direkt bei der Befüllung der Kammern wieder leer liefen.

Ein Umbau der Anlage sollte mit den vorliegenden proteinadsorbierenden Membranen die Untersuchung immobilisierter Proteine möglich machen. Die Kammer wurde für diesen Versuchsaufbau entfernt und eine Membran zwischen zwei Dichtungsringen, die aus NRSBR-Platten (Naturkautschuk) gestanzt worden waren, eingespannt (Abb. 3.1.26), auf die zuvor punktuell  $1\text{ }\mu\text{L}$  einer  $1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  Poly-L-Lysinlösung getropft worden war.





**Abb. 3.1.26:** Schematische Darstellung der umgebauten Multi-CCDD-Anlage. Anstelle einer Kammer, die von zwei Membranen begrenzt wird, befindet sich nur noch eine Membran in der Anlage, die beidseitig von den Vorratslösungen umflossen wird. Die Proteine sind auf der Membran adsorbiert.

Nach dreitägiger Versuchsdauer zeigte sich, dass alle untersuchten Nitrocellulosemembranen in der Apparatur aufgrund ihrer zu geringen Stabilität gerissen waren. Die PVDF-Membranen waren beidseitig mit Kristallen überzogen. Daneben hatten sich alle Membranen bräunlich verfärbt, da die hier verwendeten Dichtungsringe nicht inert gegenüber den vorbeiströmenden Lösungen waren. Es konnte auf den PVDF-Membranen kein Unterschied zwischen der punktuell vorhandenen Proteinklösung und der umgebenden undotierten Membran erkannt werden. Da die Membranen nicht dafür ausgelegt sind, dass eine Lösung kontinuierlich über drei Tage über sie strömt, ist zu vermuten, dass durch die Fließgeschwindigkeit der Lösungen ein Großteil der adsorbierten Proteine von den Membranen gewaschen wurde. Ebenso denkbar ist, dass der dichte Kristallrasen die additivdirigierten Kristalle überwachsen hatte.

Mehrmalige Versuche, die Dichtungsringe aus Naturkautschuk zu reinigen und keine bräunlichen Verfärbungen zu erhalten, schlugen fehl.

Die systematische Untersuchung der Multi-CCDD-Anlage zeigte, dass eine Verwendung dieser Anlage für Kristallisationsexperimente im Kompartiment nicht möglich ist.

Untersuchungen mit immobilisierten Proteinen scheinen auf PVDF-Membranen denkbar zu sein, wenn die Fließgeschwindigkeit der vorbeiströmenden Lösungen gedrosselt wird und inerte Dichtungsringe verwendet werden können. Hingegen ist die Verwendung von Nitrocellulosemembranen nicht zweckmäßig, da diese für die vorgesehene Anwendung zu brüchig sind und somit nicht defektfrei in die Anlage eingespannt werden können.

Für die ursprünglich angedachte Untersuchung von frei in Lösung befindlichen Additiven ist es notwendig, ein geeignetes Membransystem zu finden. Die Anforderungen für diese Membranen sind eine geringe Porengröße von maximal 2-4 nm, um die verwendeten Additive in der Kammer zurückhalten zu können. Zusätzlich sollten die Membranen für eine einfache Handhabung stabil und reißfest sein und keinen Einfluss auf die diffundierenden Calcium- und Carbonationen ausüben. Trotz der negativen Erfahrungen mit den Dialyseschläuchen bietet sich eine systematische Untersuchung der auf dem Markt befindlichen Fabrikate an. Neben der guten Reißfestigkeit bieten diese Membranen auch die notwendigen geringen Porengrößen. Es ist zu vermuten, dass in dem großen Angebot der Dialysemembranen auch solche zu finden sind, die in wässriger Umgebung keine negative Ladung tragen und somit für die vorliegenden Untersuchungen geeignet wären. Zusätzlich könnte über einen Umbau nachgedacht werden, bei dem die Membranen einer geringen elektrischen Spannung ausgesetzt werden, so dass sich Membranpotentiale ausbilden und damit die negative Ladung auf der Carbonatseite ~~Ausgeleitet werden kann~~. ~~abschließen wird~~ Es lässt sich sagen, dass die vorliegende Anlage durch das geringe Volumen in der Kristallisationskammer und somit der geringen Menge an einzusetzendem Additiv als auch durch die konstanten Bedingungen für die gezielte Untersuchung der Biomineralisationsprozesse richtige Ansätze zeigt. Um die Anlage für die Kristallisation im Kompartiment nutzen zu können, muss eine geeignete Kristallisationsmembran gefunden werden, die die geforderten Eigenschaften einer geringen Porengröße, hoher Reißfestigkeit und geringer Einflussnahme auf die Kristallisation aufweist.

Die Untersuchung von immobilisierten Proteinen auf die Kristallisation ist zudem möglich, wenn in der in Abbildung 3.1.26 dargestellten Anlage geeignete Dichtungsringe eingesetzt werden und die Fließgeschwindigkeit der vorbeiströmenden Lösungen gedrosselt werden kann.

### 3.2 Calciumphosphate

Calciumphosphate sind weit verbreitete Mineralien, die geologisch in Sedimentgesteinen vorkommen. Sie kristallisieren überwiegend in der hexagonalen Apatitstruktur, in die häufig Fremdionen eingebaut werden. Strukturell sind Ortho- ( $\text{PO}_4^{3-}$ ), Pyro- ( $\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$ ) und Polyphosphate ( $(\text{PO}_3)_n^{n-}$ ) zu unterscheiden. In der Industrie werden sie bevorzugt als Düngemittel, aber auch als Schleif- oder Säuerungsmittel eingesetzt. Sie sind kaum bis schwer in Wasser, aber gut in Säuren löslich. Das Hauptaugenmerk dieser Arbeit liegt auf den Orthophosphaten, da diese sowohl in der Industrie als auch in der Biomineralisation eine große Rolle spielen<sup>[16]</sup>. Die Löslichkeit in Wasser nimmt mit zunehmendem Säuregrad zu, der mit kleiner werdendem Calcium-zu-Phosphatverhältnis(Ca:P)-Verhältnis steigt. Eine Übersicht der bekannten Orthophosphate findet sich in Tabelle 3.2.1.

**Tab. 3.2.1:** Eigenschaften der Calciumorthophosphate <sup>[148-150]</sup>

Verbindung	Abkürzung	Formel	Ca:P-Verhältnis	Dichte / g cm <sup>-3</sup>	Kristallsystem
Monocalciumphosphat-Monohydrat	MCPM	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,5	2,23	triklin
Monocalciumphosphat-Anhydrit	MCPA	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$	0,5	2,58	triklin
Dicalciumphosphat-Dihydrat	DCPD	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,0	2,32	monoklin
Dicalciumphosphat-Anhydrit	DCPA	$\text{CaHPO}_4$	1,0	2,89	triklin
Octacalciumphosphat	OCP	$\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1,33	2,61	triklin
$\alpha$ -Tricalciumphosphat	$\alpha$ -TCP	$\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	1,5	2,86	monoklin
$\beta$ -Tricalciumphosphat	$\beta$ -TCP	$\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	1,5	3,07	rhomboedrisch
amorphes Calciumphosphat	ACP	$\text{Ca}_x(\text{HPO}_4)_y \cdot n\text{H}_2\text{O}$	1,2-2,2	k. A.	röntgenamorph
Hydroxylapatit	HAP	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	1,67	3,16	monoklin oder hexagonal
Tetracalciumphosphat	TTCP	$\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$	2,0	3,05	monoklin

Calciumorthophosphate findet man als Biomineral in Knochen und Zähnen von Wirbeltieren, aber auch in einigen Muschelschalen. Die pathologischen Ausfällungen von Calciumphosphaten sind als Zahn- und Blasenstein und als Mineralisierung von Weichgeweben wie Aorten und Herzklappen bekannt. Sie bestehen chemisch aus calciumdefizitärem carbonathaltigen HAP ( $\text{Ca}_{5-x}(\text{PO}_4/\text{CO}_3)_3\text{OH}$ ), in denen Phosphat teilweise durch Carbonat substituiert wurde.

Bedingt durch die gesundheitlichen Schäden, die bis zum Tod führen können, ist die

Untersuchung der pathologischen Mineralisation im Körper Gegenstand verschiedenster Forschungsrichtungen. Erst in den letzten Jahren beginnen sich aus der rein medizinischen oder chemischen Betrachtung dieser Probleme Forscher in interdisziplinären Gruppen mit dem System der pathologischen Mineralisation auseinander zu setzen, um die Biomineralisation zu verstehen<sup>[151]</sup>. Bei der pathologischen Mineralisation in xenogenen Herzklappenimplantaten fanden sich Hinweise darauf, dass die Keimbildung an Phospholipidgruppen toter Zellen beginnt<sup>[152-156]</sup>. Ebenso werden Interaktionen von Proteinen und Calcium vermutet, da Osteopontin (ein Protein der Knochenmatrix) in anorganischen Ablagerungen von Herzklappen nachgewiesen werden konnte<sup>[157]</sup>. Andere Arbeiten zeigten sowohl einen Zusammenhang zwischen dem Mineralisationsgrad und der durch die Fixierung mit Glutaraldehyd entstehenden freien Aldehydgruppen als auch dem im Implantat verbleibendem Glutaraldehyd auf<sup>[158-160]</sup>. Zusätzlich wird die bei der Fixierung einhergehende Entfernung der Glukosaminoglykane (GAG) diskutiert, die sich als natürliche Kristallisationsinhibitoren erwiesen haben<sup>[161, 162]</sup>. Funde von erhöhter Calcifizierung an stressinduzierten Arealen konnten durch holographische interferometrische Messungen untermauert werden<sup>[163, 164]</sup> und sind möglicherweise durch eine Veränderung der Faserstruktur während der Fixierung bedingt<sup>[165]</sup>.

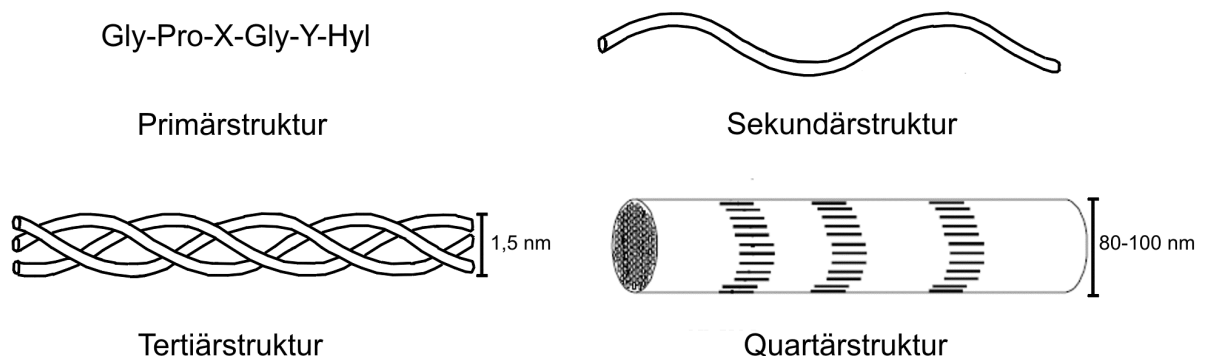
Zum Verständnis der Mineralisation bedarf es der genauen Kenntnis aller Einflussgrößen, weshalb neuere Versuchsansätze mit *in vitro*-Systemen arbeiten, die unter definierten Bedingungen laufen<sup>[166]</sup>. So konnte eine geringere Mineralisationsanfälligkeit von Rinderpericard gegenüber Schweineherzklappen nachgewiesen werden<sup>[167]</sup>. Ebenso wird nun OCP als Vorstufe zum HAP diskutiert<sup>[46]</sup>.

Es zeigt sich, dass der Mechanismus der Mineralisation in xenogenen Herzklappenprothesen nicht vollständig verstanden ist. Die aufgeführten, verschiedenen Hypothesen zur Calcifizierung stellen mit großer Wahrscheinlichkeit Teilprozesse dar, die im biologischen System ablaufen. Sowohl die Vernetzung durch z. B. Glutaraldehyd als auch verbleibende Zellen und Proteine scheinen allerdings eine Schlüsselrolle in der Calcifizierung von Herzklappengewebe einzunehmen.

### 3.2.1 Nachahmung der Kristallisation in Materialien für Herzklappenprothesen

Das Herz ist als Hohlmuskel aus zwei Vorhöfen und zwei Kammern aufgebaut, die vom Herzbeutel (Pericard) umschlossen werden. Den Rückfluss des Blutes in die Kammern bzw. Vorhöfe verhindern Herzklappen, die aus Collagenfasern und Elastin aufgebaut sind. Jede dieser Klappen öffnet und schließt sich etwa 100000 Mal am Tag, so dass 3,7 Milliarden Zyklen im Laufe eines durchschnittlichen Menschenlebens in Ruhe- und Belastungsphasen zustande kommen<sup>[168-170]</sup>.

Der Begriff Collagen bezeichnet eine Gruppe von Proteinen, die supramolekulare Matrixstrukturen bilden und zur besseren Unterscheidung in Typ I bis XXVIII eingeteilt sind. Sie dienen allgemein der mechanischen Verstärkung von Bindegewebe in Vertebraten<sup>[171, 172]</sup>. Die häufigsten Typen sind Typ I in Knochen, Haut und Sehnen und Typ III in Blutgefäßen, die charakteristische Faserbündel ausbilden<sup>[173]</sup>. Allen gemein ist die rechtsdrehende, aus drei  $\alpha$ -Ketten aufgebaute Tertiärstruktur, die sich aus linksdrehenden helicalen Ketten von etwa 1000 Aminosäuren zusammensetzt. Um diese Struktur zu ermöglichen, muss jede dritte Aminosäure in der Primärstruktur Glycin (Gly) sein. Für die Stabilität ebenso wichtig sind Prolin (Pro) und Hydroxylysin (Hyl). Die Collagenmoleküle besitzen eine axiale Periodizität (Quartärstruktur), die im Elektronenmikroskop sichtbar wird. Diese ist bedingt durch die aus fünf Tripelhelices zusammengesetzten Mikrofibrillen ( $\varnothing = 3,5-4 \text{ nm}$ )<sup>[174-177]</sup>, die in Bündeln von ca. 1000 Mikrofibrillen über laterale und an den Enden stattfindende Verknüpfungen ein Bandenmuster in den Fibrillen ( $\varnothing = 80-100 \text{ nm}$ ) ausbilden<sup>[176, 178, 179]</sup> (Abb. 3.2.1). Etwa 500 Fibrillen formen eine Faser mit Durchmessern zwischen  $1-4 \mu\text{m}$ <sup>[180]</sup>, die zu Faserbündeln aggregieren ( $\varnothing = 10-100 \mu\text{m}$ )<sup>[178]</sup>. Dieser Aufbau bedingt die hohe Zugfestigkeit der Collagenfaserbündel.



**Abb. 3.2.1:** Schematische Darstellung des molekularen Aufbaus des faserbildenden Collagens.

Im Folgenden sollten verschiedene Materialien hinsichtlich ihrer Anfälligkeit zur Mineralisierung getestet werden, die für die Herstellung künstlicher Herzklappenprothesen genutzt werden. Interessant war nicht nur eine mögliche unterschiedliche Reaktion in den Gewebetypen, sondern vor allem der Ort der Mineralisation. Die Versuche sollten die Frage klären, ob die Collagenfasern vom Mineral infiltriert wurden oder ob an Bruchstellen von Collagenbündeln eine stärkere Mineralisation auftrat.

### 3.2.1.1 Experimentelle Vorgehensweise

Untersucht wurden Stücke von Rinderpericard, Stücke einer Schweineaorta und ein Herzklappensegel vom Schwein, die von den Kooperationspartnern M. Krings und B. Glasmacher in Glutaraldehyd<sup>[181]</sup> fixiert und in Formaldehyd (4 %, pH 5,6) gelagert wurden.

Die Proben wurden für die Versuche dreimal mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen, von Fettgewebe befreit und anschließend in die in Kapitel 3.1.3 erläuterte CCDD-Anlage eingespannt.

Als Kristallisationslösungen wurden die Stammlösungen der SBF-Lösung (*simulated body fluid*)<sup>[182]</sup> angesetzt. Über die Vereinigung der beiden Stammlösungen wird eine künstliche Körperflüssigkeit hergestellt, die der Ionenzusammensetzung des Blutes im Wesentlichen entspricht. Anstelle die Lösungen zum SBF zu vereinen, wurden sie separat in die beiden Kristallisationskammern gegeben, so dass sich erst durch den Kontakt der Lösungen im Gewebe das eigentliche SBF ausbilden konnte. Um eine methodenbedingte, ortsabhängige Kristallisation auszuschließen, wurden die Gewebeinnen- und -außenseiten abwechselnd zur Calcium- und zur Phosphatlösung in unterschiedlichen Versuchen ausgerichtet. Damit eine Kristallisation innerhalb von drei Tagen Versuchsdauer beobachten werden konnte, wurden in den Stammlösungen die doppelten Calcium- und Phosphatkonzentrationen verwendet. Die Zusammensetzungen der Versuchslösungen im Vergleich mit der üblichen SBF-Lösung sind in Tabelle 3.2.2 zu finden. Die Versuche wurden bei 37 °C und konstantem pH-Wert von 7,4 in der Calciumlösung durchgeführt.

Nach Versuchsende wurden die Proben aus der Apparatur entnommen, zur Entfernung von Lösungsrückständen kurz mit Aceton abgespült und über eine Verdünnungsreihe in absolutes Aceton überführt. Mittels des Verfahrens der „Kritischen-Punkt-Trocknung“ wurden die Proben für die Untersuchungen im REM vorbereitet und eine Hälfte für 1 min bei 20 V mit Gold/ Palladium besputtert.

**Tab. 3.2.2:** Zusammensetzung der verwendeten SBF-Lösungen im Vergleich zur typischen SBF-Lösung (nur die Konzentration von  $\text{CaCl}_2$  und  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  wurden verdoppelt.)

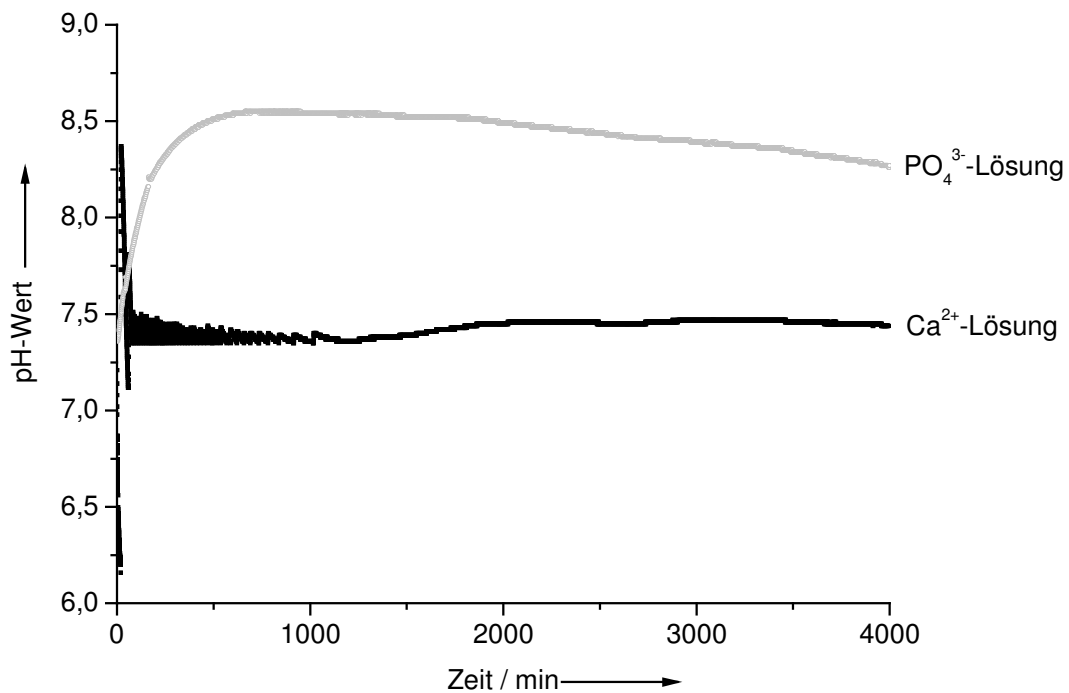
Bestandteil	SBF <sup>[182]</sup> / mM		verwendete SBF / mM	
	$\text{Ca}^{2+}$ - Stammlösung	$\text{PO}_4^{3-}$ - Stammlösung	$\text{Ca}^{2+}$ -Stammlösung (2 x $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration)	$\text{PO}_4^{3-}$ -Stammlösung (2 x $\text{PO}_4^{3-}$ -Konzentration)
NaCl	136,8	-	136,8	-
KCl	3,0	-	3,0	-
$\text{MgCl}_2$	1,5	-	1,5	-
$\text{CaCl}_2$	2,5	-	5,0	-
$\text{Na}_2\text{SO}_4$	-	0,5	-	0,5
$\text{NaHCO}_3$	-	4,2	-	4,2
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	-	1,0	-	2,0

Von jeder Probe wurden im REM sowohl beide Oberflächen als auch eine Schnitt-aufsicht untersucht und EDX-Spektren der Kristallisationsprodukte aufgenommen. Die zweite Hälfte jeder Probe wurde im Pulverdiffraktometer (HASYLAB, Messplatz B2) in Transmission auf Kaptonfolien analysiert. Hierfür wurde die Probe mit einem Klebestreifen auf dem Probenhalter fixiert.

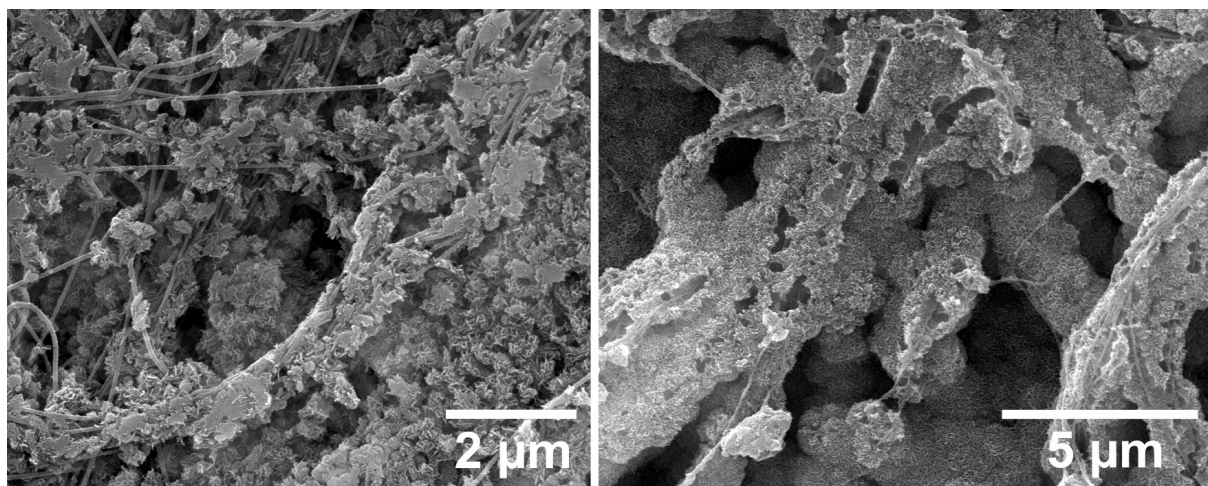
### 3.2.1.2 Ergebnisse und Diskussion

Der pH-Wert der Phosphatstammlösung konnte während der Versuche nicht konstant gehalten werden. Das Programm des Steuerungsrechners reagierte nur auf ein Fallen des pH-Wertes unter den genannten Schwellenwert. Die Phosphatlösung reagierte hingegen als Puffersystem bei höheren pH-Werten. Nach dem Einstellen auf einen pH-Wert von 7,4 stieg er innerhalb der ersten zehn Stunden auf einen Wert von 8,5 an. Das langsame Absinken des pH-Wertes auf 8,3 im Verlauf der drei Tage ist auf die Verarmung der Lösung an Ionen durch die Kristallisation zurückzuführen (Abb. 3.2.2).

In den im REM untersuchten Proben konnte eine deutliche Abhängigkeit der Kristallisation von der angrenzenden Lösung erkannt werden. Die Kristallisation fand unabhängig von der anliegenden Gewebeseite bevorzugt auf der der Phosphatlösung zugewandten Seite statt. Die Experimente mit Rinderpericard zeigten dort reproduzierbar spitze, an Splitter erinnernde Kristallisationsprodukte, die sich zu globulären Strukturen um einzelne Collagenfasern zusammenlagerten und dichte Schichten bildeten (Abb. 3.2.3).



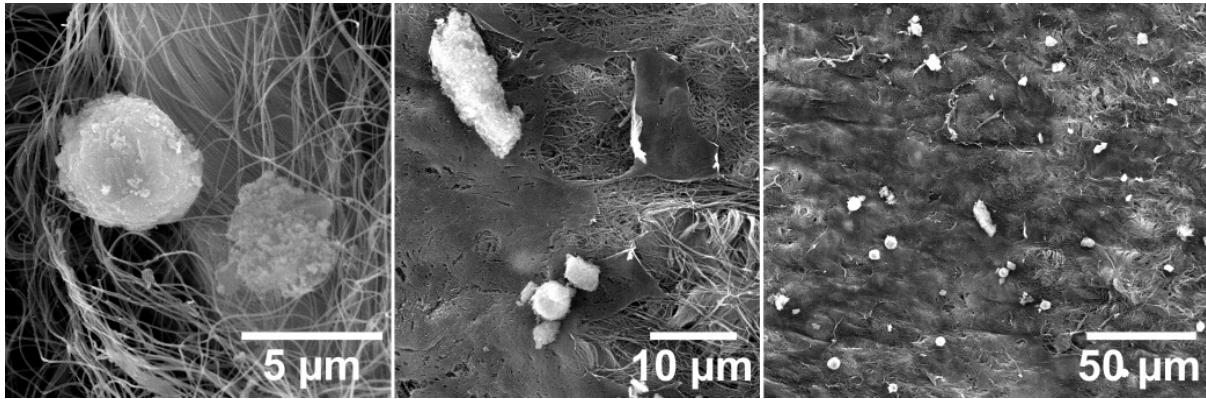
**Abb. 3.2.2:** Darstellung des pH-Wert-Verlaufs in den beiden Kristallisationslösungen. Deutlich ist an der Kurve der Calciumlösung die erfolgreiche Regelung auf einen pH von 7,4 zu erkennen, während die Kurve der Phosphatlösung unregelt ansteigt.



**Abb. 3.2.3:** REM-Aufnahmen der Kristallisationsprodukte im Rinderpericard auf der Seite der Phosphatlösung. Die Collagenfasern wurden von den Kristallen umwachsen.

Auf dem der Calciumseite zugewandten Gewebe fanden sich hingegen kristallähnliche Gebilde von 5-20 µm Durchmesser, die auf der Oberfläche etwa gleichmäßig verteilt vorlagen. Bei diesen Präzipitaten war kein direktes Umwachsen der Collagenfasern erkennbar (Abb. 3.2.4).

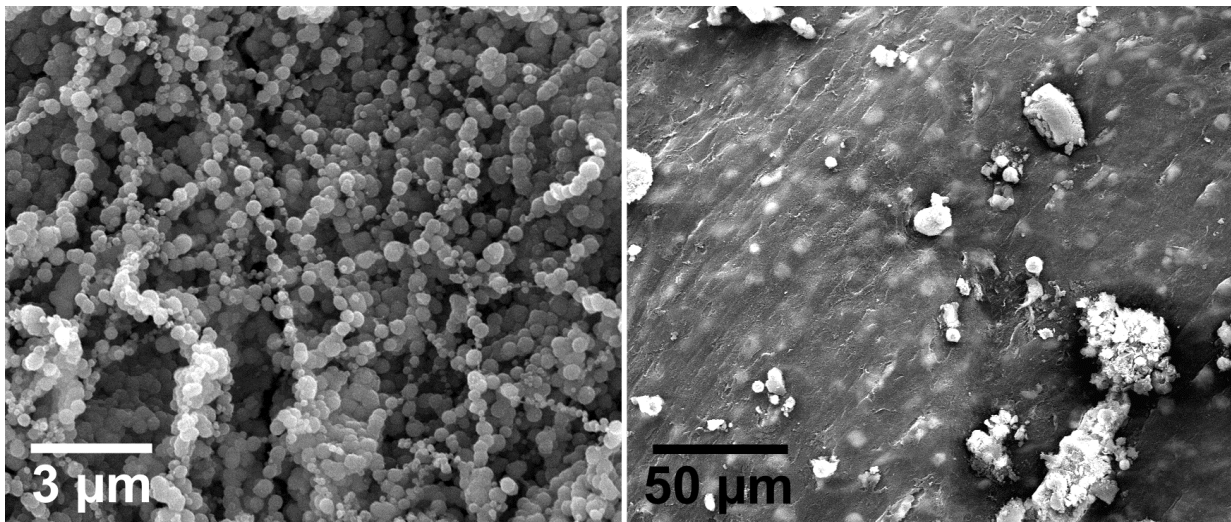




**Abb. 3.2.4:** REM-Aufnahmen von 5-10 µm großen Kristallen, die auf der Seite der Calciumlösung auf dem Rinderpericard auskristallisierten. Die mittlere Aufnahme zeigt zudem eine sich in Ablösung befindliche dünne Schicht.

Zusätzlich waren dünne Schichten aus kleinen Agglomeraten auf der Oberfläche zu erkennen.

Die Herzklappensegel des Schweins wiesen auf einer Seite sehr viel größere Kristallite mit Durchmessern von 25-50 µm auf. Zusätzlich traten die bereits beim Rinderpericard beobachteten dünnen, oberflächlichen Schichten auf. Die gegenüberliegende Seite zeigte hingegen Kugeln, die auf den Collagenfasern perlschnurartig aufgereiht waren (Abb. 3.2.5).

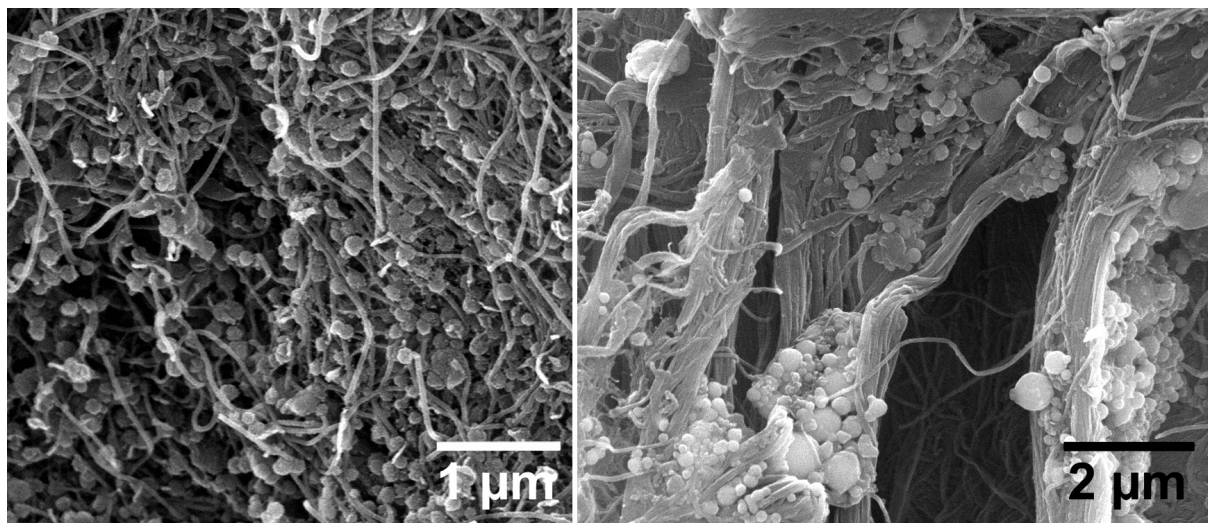


**Abb. 3.2.5:** REM-Aufnahmen der Kristallisationsprodukte auf Herzklappensegeln vom Schwein. Die beiden Aufnahmen zeigen die zwei unterschiedlichen Seiten des Segels. Eine Zuordnung zu den anliegenden Lösungen war nicht mehr möglich.

Eine Zuordnung zu den anliegenden Lösungen war nicht möglich, da bedingt durch

die geringe Größe der Herzklappen keine Markierungen vorgenommen werden konnten. Allerdings ist aufgrund der Ähnlichkeit der Kristallisationsprodukte anzunehmen, dass die dünnen Schichten im Verbund mit den großen Kristallbrocken auf der Calciumseite auskristallisierten.

Homogene Agglomerate geringen Durchmessers (ca. 200 nm) wurden auf der Oberfläche der Schweineaorta gefunden, die der Calciumseite anlag. Kugelförmige Kristalle zwischen 0,2-1  $\mu\text{m}$  fanden sich auf der Phosphatlösung zugewandten Seite (Abb. 3.2.6).



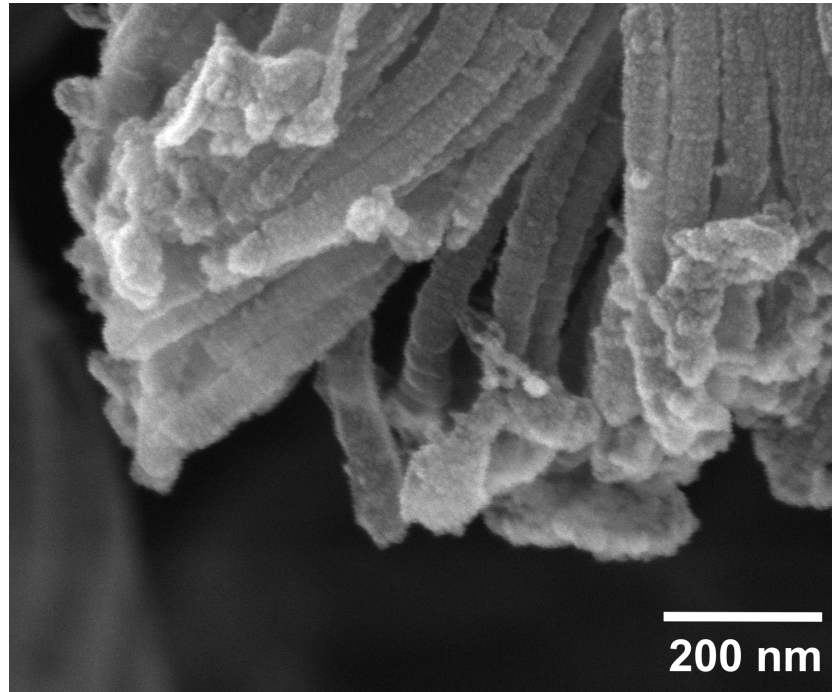
**Abb. 3.2.6:** REM-Aufnahmen der mineralisierten Schweineaorta. Weder bei den Kristallisationsprodukten auf der Seite der Calciumlösung (links) noch bei den globulären Strukturen der Phosphatseite (rechts) konnte ein Umwachsen der Collagenfasern festgestellt werden.

Auch bei diesen Präzipitaten war kein Wachstum um die Fasern herum zu beobachten, sondern nur eine Anlagerung der Kristalle an die Collagenfasern.

Untersuchungen an Schnittkanten zeigten, dass sich die Kristallisation nur an den Oberflächen abspielte und es zu keiner durchgehenden Mineralisation des Gewebes kam. Dennoch war im Vergleich zum Rinderpericard ein deutlich höherer Kraftaufwand nötig, um die Proben der Schweineaorta nach den Versuchen zu zerteilen. Unmineralisierte Proben beider Gewebe zeigten keine bemerkenswerten Unterschiede im Schnittverhalten. Dies lässt einen höheren Grad der Mineralisation in der Schweineaorta vermuten, der sich mit Daten aus der Literatur deckt<sup>[167]</sup>.

Um festzustellen, ob die Enden gebrochener Collagenfasern bevorzugte Kristallisationspunkte darstellen, wurde vor Versuchsbeginn das Gewebe mit einer Rasierklinge oberflächlich eingeschnitten. Die REM-Aufnahmen dieser Collagenenden

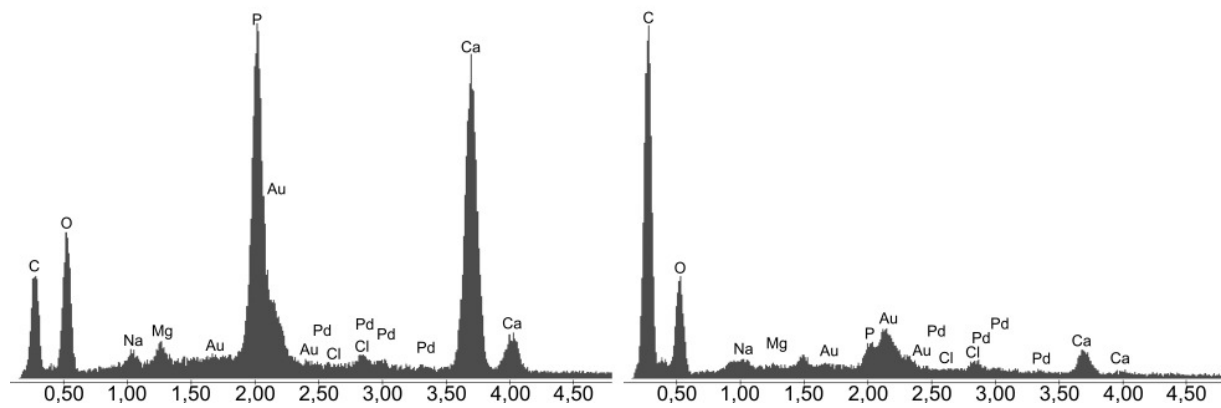
(Abb. 3.2.7) zeigten keinerlei Unterschiede zu den bereits oben erläuterten Versuchen. Es kann dementsprechend nicht bestätigt werden, dass freie Enden von Collagenfasern bevorzugte Keimbildungszentren darstellen.



**Abb. 3.2.7:** REM-Aufnahme angeschnittener Collagenfasern nach Mineralisation. An den Faserenden sind keine Kristallisationsprodukte zu erkennen.

Die im REM aufgenommenen EDX-Spektren (Abb. 3.2.8) zeigten Spuren von Natrium, Magnesium und Chlorid. Die ebenso analysierten Mengen an Kohlenstoff und Sauerstoff sind allerdings nur bedingt als eingebaute Fremdionen wie  $\text{CO}_3^{2-}$  zu interpretieren, da keine klare Abgrenzung zum umliegenden organischen Gewebe möglich war.

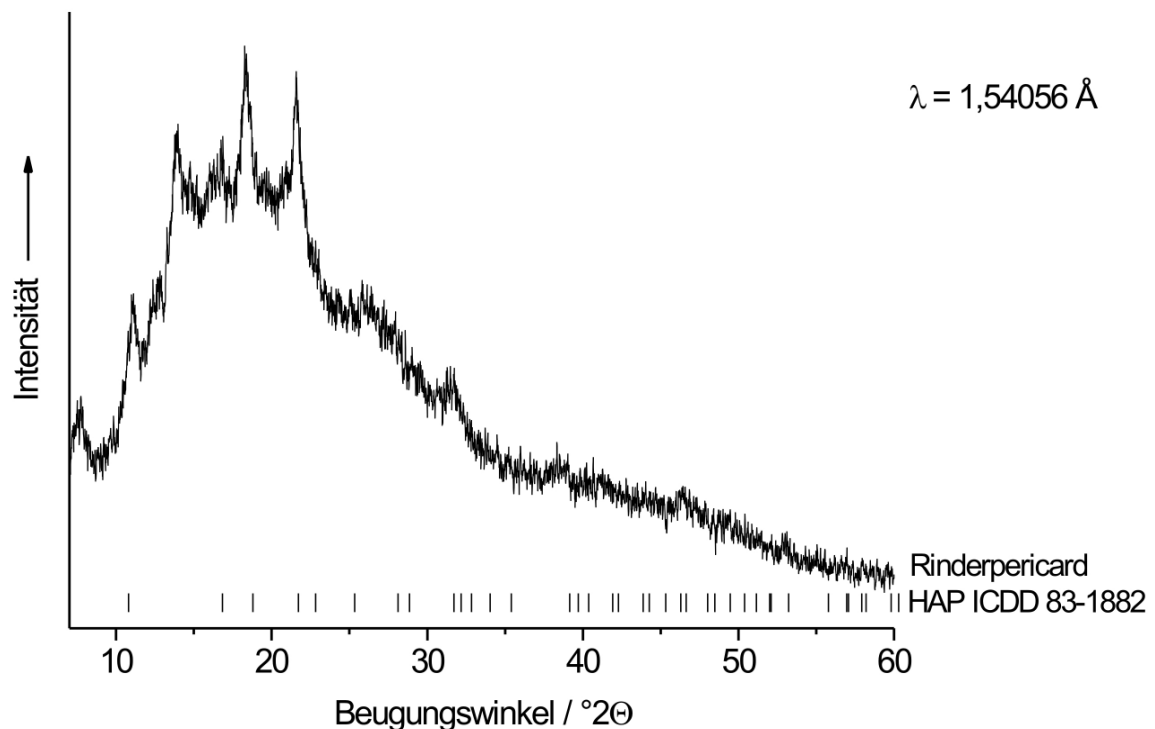
Nutzt man die quantitativen Massenangaben zur Abschätzung des molaren Ca:P-Verhältnisses, so ergaben sich auf der Phosphatseite Werte zwischen 1,2-1,5. Dieses Verhältnis entspricht amorphem bzw. calciumdefizitärem Calciumphosphat (CDHA). Die nachgewiesenen Fremdionen sprechen zudem ebenso für CDHA. Die Analysen der Präzipitate auf der Calciumseite ergaben für die großen Kristallite molare Ca:P-Verhältnisse zwischen 1,3-2,2. ACP kann hier als wahrscheinlich angenommen werden. Die ebenso auf der Calciumseite befindlichen dünnen Schichten zeigten in den EDX-Spektren nur Spuren von Calcium und Phosphat, die je nach Aufnahmeort stark schwankten.



**Abb. 3.2.8:** EDX-Spektren der Kristallisationsprodukte auf der Phosphat- (links) und Calciumseite (rechts). Während die Kristalle auf der Phosphatseite deutliche Anteile an Calcium und Phosphor aufweisen, können auf der Calciumseite nur geringe Mengen gefunden werden. Der Kohlenstoff- und Sauerstoffanteil sind hauptsächlich durch die Collagenfasern bedingt, während Gold und Palladium von der Besputterung herrühren.

Die berechneten Ca:P-Verhältnisse lieferten keinen sinnvollen Hinweis auf die vorliegende Calciumphosphatphase. Die auf der zur Calciumlösung hin ausgerichteten Gewebeoberfläche abgeschiedenen Schichten konnten nur als calcium- und phosphorhaltig beschrieben werden.

Untersuchungen der Proben im Pulverdiffraktometer halfen bei der Identifizierung der Präzipitate nur wenig weiter, da nur eine geringer Zahl schwacher Reflexe zu erkennen war (Abb. 3.2.9). Das zu beobachtende Intensitätsplateau zwischen 15-30 °2 $\theta$  und die darin enthaltenen Reflexe bei ca. 11 und 14 °2 $\theta$  konnten in Vergleichsmessungen dem Probengewebe zugeordnet werden. Diese überlagerten die Intensitäten der gesuchten Calciumphosphatpeaks zum Teil. Die dennoch sichtbaren Reflexe konnten hinsichtlich ihrer Lage und hinsichtlich ihrer relativen Intensitäten einer hexagonalen Struktur des Hydroxylapatits zugeordnet werden, dessen Summenformel gemittelt über alle Elementarzellen  $\text{Ca}_{3,2}\text{P}_{2,3}\text{O}_{17,2}\text{H}_{16,4}$  entspricht.



**Abb. 3.2.9:** Hochauflösendes Pulverdiffraktogramm des mineralisierten Rinderpericards. Die Reflexlage und die relative Intensität stimmen mit dem ICDD-Eintrag gut überein. Das Intensitätsplateau zwischen 15-30 °2Θ als auch die Reflexe bei ca. 11 und 14 °2Θ sind auf die Collagenfasermatrix zurückzuführen.

Dieser ICDD-Datenbankeintrag wurde aus Neutronen- und Röntgenpulverdiffraktogrammen von Zahnschmelz berechnet<sup>[183]</sup>. Amorphes Calciumphosphat konnte aufgrund des erhöhten Hintergrundrauschens, welches durch die Collagenfasern hervorgerufen wurde, nicht ausgeschlossen werden. Potentiell vorhandenes ACP würde durch dieses Rauschen überdeckt werden.

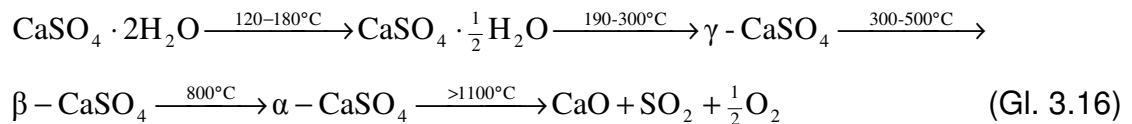
In den vorliegenden Versuchen konnte wie bereits in der Literatur beschrieben<sup>[167]</sup> gezeigt werden, dass das Rinderpericard weniger stark mineralisiert als die Schweineaorta. Zudem ist ein Kristallisationsstartpunkt an gebrochenen Collagenfasern auszuschließen. Ebenso konnte keine Vorstufe zum HAP in den Geweben nachgewiesen werden. Die Kristallisation von HAP im phosphatreichen Milieu zeigt zudem, dass ein erhöhter Phosphatspiegel ebenso zur Mineralisation beitragen kann. Neuere Untersuchungen an Dialysepatienten, die besonders anfällig für pathogene Calcifikation sind, zeigten, dass der Calciumspiegel im Blut von gesunden und von kranken Probanden in etwa konstant bleibt, während der Phosphatspiegel bei

Dialysepatienten stark schwankt und besonders hoch ausfällt <sup>[184, 185]</sup>. Entsprechend werden neue Methoden gesucht, um diesen erhöhten Phosphatspiegel zu senken. Die vorliegenden Ergebnisse fügen sich gut in diese Erkenntnisse ein.

Das vorliegende System eignet sich aufbaubedingt nur schlecht für die Simulation der Mineralisation in Herzklappenimplantaten. Neben der fehlenden, für Herzklappen typischen Bewegung kommt noch die ungleiche Verteilung der beiden Stammlösungen hinzu, die den physiologischen Gegebenheiten widerspricht. Sowohl ein Vergleich verschiedener, für diese Implantate vorgesehene Gewebetypen als auch der Vergleich verschieden fixierter Gewebe im Bezug auf ihre Mineralisationsanfälligkeit wären dennoch in der vorliegenden Apparatur schnell und reproduzierbar möglich. Die Ergebnisse zeigen zudem, dass das System „Calciumphosphat“ trotz der nur ungenau bestimmten Phase reproduzierbarer und entsprechend stabiler in der CCDD-Anlage eingesetzt werden kann als das in Kapitel 3.1.3 beschriebene System „Calciumcarbonat“.

### 3.3 Calciumsulfat

Calciumsulfat findet man in der Natur vorwiegend als Dihydrat ( $\text{CaSO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ , Gips) und Anhydrit ( $\text{CaSO}_4$ ), seltener sind Vorkommen vom Halbhidrat ( $\text{CaSO}_4 \cdot 0,5 \text{H}_2\text{O}$ , Bassanit). Die Pseudopolymorphe unterscheiden sich durch das im Kristallgitter inkorporierte Wasser und können durch Wasserzugabe oder Entnahme (thermische Behandlung) ineinander überführt werden (Gl. 3.16)



Der reversible Prozess (Hydratation von Bassanit und Anhydrit) führt durch den Einbau von Wassermolekülen in die Kristallstruktur zu einem feinfaserigen Gipsgefüge, welches u. a. in der Bauindustrie Verwendung findet (Abbinden von Gips). Tiefergehende Informationen zum System  $\text{CaSO}_4$  und seiner Fähigkeit zur reversiblen Wasserbindung sind in der Literatur zu finden<sup>[186, 187]</sup>.

In Tabelle 3.3.1 sind die Eigenschaften der Polymorphe zusammengefasst, wobei auch die metastabile Phase Anhydrit-III und die Hochtemperaturphase Anhydrit-I des Anhydrits aufgeführt sind.

**Tab. 3.3.1:** Kristallographische Eigenschaften von Calciumsulfat und seinen Hydraten<sup>[188-193]</sup>

Mineralname	Gips	Bassanit	Anhydrit-III	Anhydrit-II	Anhydrit-I
Summenformel	$\text{CaSO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	$\text{CaSO}_4 \cdot 0,5 \text{H}_2\text{O}$	$\gamma\text{-CaSO}_4$	$\beta\text{-CaSO}_4$	$\alpha\text{-CaSO}_4$
Kristallsystem	monoklin	trigonal	hexagonal	orthorhombisch	trigonal
Dichte / $\text{g cm}^{-3}$	2,31	2,62-2,76	2,58	2,93-2,97	3,0
Mohs-Härte	2	unbekannt	3	3,2	3,5
Entstehungstemperatur / $^\circ\text{C}$	<65	120-180	190-300	300-500	>800
Löslichkeit in $\text{H}_2\text{O}$ bei $20^\circ\text{C}$ / $\text{g L}^{-1}$	2,05	6,7	8,8	2,7	nicht löslich
Zwillingsbildung	häufig auf {100}, seltener auf {101}	nur verzwillingte Strukturen in der Literatur beschrieben	nicht bekannt	einfach oder wiederholt auf {011}	nicht bekannt

Die eingebauten Wassermoleküle tragen grundlegend zum Aufbau der Kristallstrukturen bei. So finden sich im Dihydrat alternierende Doppelschichten von  $\text{CaO}_6$ -Oktaedern und doppelagige Schichten von Wasserstoffatomen, die der Grund für die

bevorzugte Ausbildung von (0k0)-Spaltflächen sind<sup>[194]</sup>. Die Sauerstoffatome an den Ecken der Oktaeder bilden entweder Wassermoleküle oder  $\text{SO}_4$ -Tetraeder aus.

Im Halbhydrat sind die Wassermoleküle hingegen in Kanälen entlang der *c*-Achse angeordnet. Während das Grundgerüst wie beim Dihydrat aus  $\text{CaO}_6$ -Oktaedern und  $\text{SO}_4$ -Tetraedern aufgebaut ist, tragen die Wassermoleküle mittels Wasserstoffbrückenbindungen zur Stabilität der Struktur bei. Da bisher keine Untersuchungen an unverzwilligten Halbhydratkristallen möglich waren, beruhen die in der Literatur zu findenden Strukturlösungen auf einem trigonalen System, dem durch gruppentheoretische Überlegungen eine monokline Überstruktur zugeordnet werden konnte<sup>[192, 195]</sup>.

Die Struktur des „löslichen“ Anhydrit-III ist mit der des Halbhydrats nahezu identisch und unterscheidet sich vom Aufbau her nur durch die unbesetzten Kanäle entlang der *c*-Achse. Entsprechend leicht neigt es zur Aufnahme von Kristallwasser aus der umgebenden Luft. Auch hier waren wie beim Halbhydrat nur Pulverdiffraktogramme zur Strukturlösung zugänglich<sup>[196]</sup>. Die Unterscheidung zwischen den beiden Phasen ist nur durch Einkristallstrukturlösungen möglich.

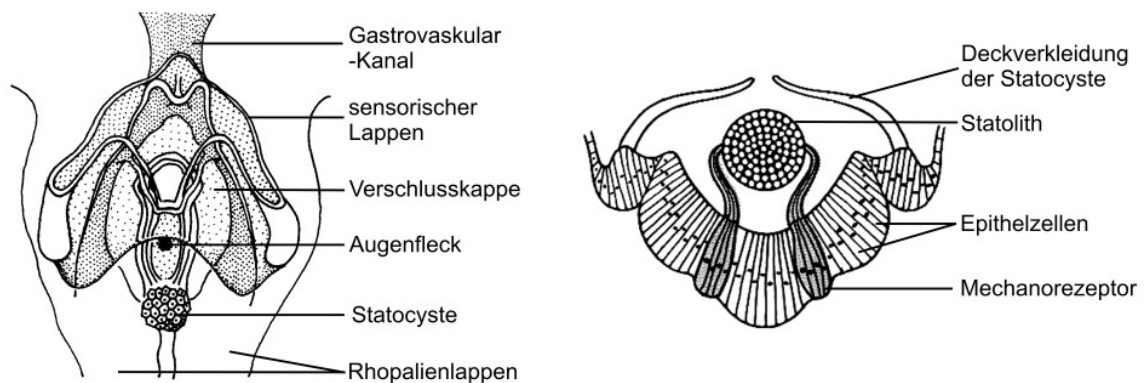
Im Gegensatz zum Übergang vom Halbhydrat ins Anhydrit-III, bei dem die Kristallstruktur erhalten bleibt und nur das Kristallwasser entfernt wird, findet beim Übergang ins Anhydrit-II eine Umorganisation in der Kristallstruktur statt. Die Struktur bildet sich aus  $\text{CaO}_6$ -Oktaedern und  $\text{SO}_4$ -Tetraedern, die über gemeinsame Polyederkanten miteinander verknüpft sind. Die Hochtemperaturphase Anhydrit-I ist hier nur der Vollständigkeit halber angegeben. Sie entsteht erst bei 1180 °C und zerfällt bereits wieder oberhalb von 1300 °C in CaO,  $\text{SO}_2$  und Sauerstoff<sup>[197]</sup>.

Als Biomineral ist Calciumsulfat bisher nur in den Schweresinnesorganen einiger Quallenarten, im „Zahnbürstenbaum“ *Salvadora persica*<sup>[198]</sup> und in Grünalgen der Familie Desmidiaceae nachgewiesen worden<sup>[199]</sup>. Frühere Aussagen über Calciumsulfat in Grünalgen der Gattung Closterium (Desmidiaceae)<sup>[200]</sup> stellten sich als inkorrekt heraus, da es sich um Bariumsulfatkristalle handelte, die Spuren von Strontium aufwiesen<sup>[201, 202]</sup>. Während in den Quallen nach anfänglichen Annahmen von Gipskristallen<sup>[203-205]</sup> eindeutig das Halbhydrat identifiziert wurde<sup>[206-208]</sup>, ist diese Aussage für *Salvadora persica* kritisch zu betrachten. Im ariden Klima der Pflanzen kann auch die Umwandlung von Gips zu Bassanit in den älteren Zweigen die Ursache für Bassanitfunde sein.



### 3.3.1 Charakterisierung der Rhopalien von Quallen

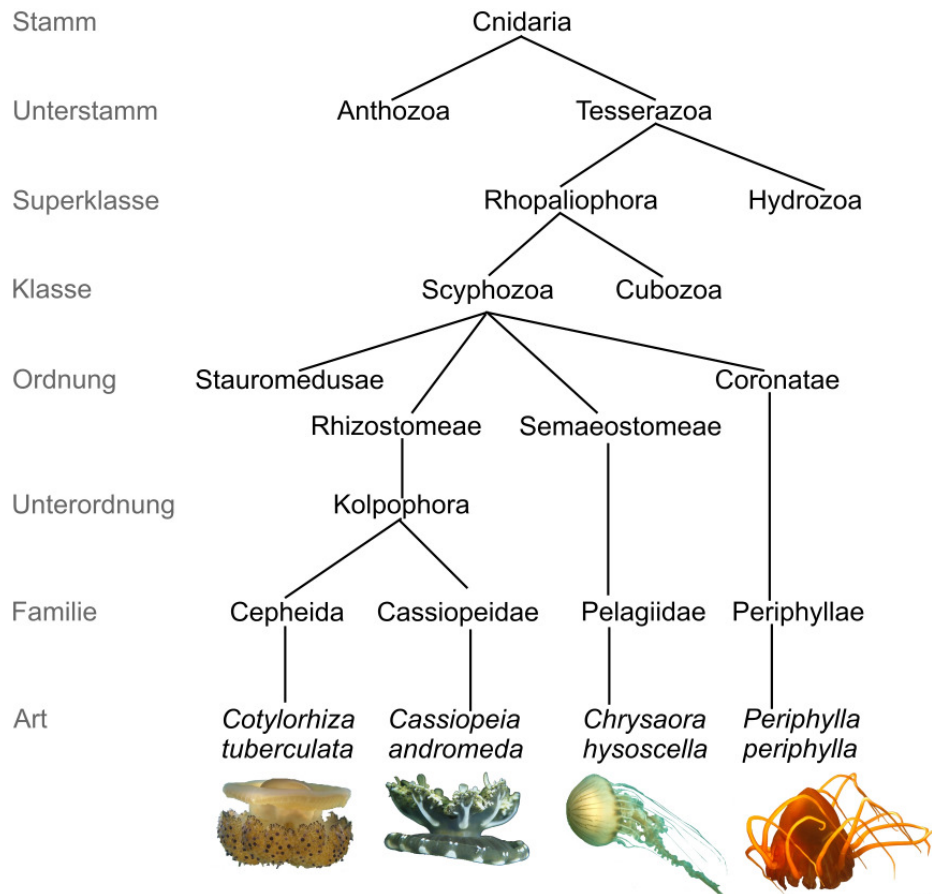
Der Stamm der Cnidaria (Nesseltiere) umfasst die Unterstämme Anthozoa (echte Korallen, Anemonen und Seefedern) und Tesserazoa, zu dem die Hydrozoa, Cubozoa (Würfelquallen) und Scyphozoa (Schirmquallen) gehören. Die Cnidaria sind bis auf vereinzelte Arten der Hydrozoa marine Organismen. Sie alle besitzen Nesselkapseln, die sowohl zur Nahrungssuche als auch zum Schutz vor Feinden dienen. Mit Ausnahme der Anthozoa und einiger weniger Arten der anderen Klassen treten die Cnidaria in den zwei Generationsformen des sessilen Polypen und der pelagischen Meduse auf. Letztere bilden Sinnesorgane, wie einfache Augen, Statocysten (Schweresinnesrezeptoren) oder komplexe Rhopalien (Abb. 3.3.1).



**Abb. 3.3.1:** Schematische Darstellung eines Rhopaliums (links, nach I. Livingstone ©BIODIDAC) und einer Statocyste (rechts)<sup>[209]</sup>.

Die kolbenförmigen Rhopalien liegen im Mantelrand und bestehen meist aus einer Statocyste, einem Flach- oder Becherauge sowie einer chemorezeptorischen Sinnesgrube.

Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung der in Rhopalien vorliegenden Statocysten verschiedener Quallenarten aus der Klasse der Scyphozoa (Abb. 3.3.2). Neben der Analyse der mineralischen Substanz sollte der strukturelle Aufbau der einzelnen Kristalle im Statolith untersucht werden. Während die Analyse des Minerals Aufschluss über Verwandtschaftsbeziehungen innerhalb der einzelnen Klassen geben kann <sup>[206]</sup>, trägt die Analyse der Kristalle und der sie umgebenden Zellen maßgeblich zum Verständnis ihrer Bildung bei.



**Abb. 3.3.2:** Phylogenetischer Stammbaum der untersuchten Quallenarten nach Ax (1995)<sup>[210]</sup>.

Die zu den Kompassquallen gehörende *Chrysaora hysoscella* (Linné, 1766<sup>[211]</sup>) lebt in den Küstengewässern Großbritanniens. Ihr gelbweißer Schirm, der mit seinen braunen Markierungen an einen Kompass erinnert, kann bis zu 30 cm Durchmesser annehmen<sup>[212]</sup>. *Cotylorhiza tuberculata*, die erstmal 1778 von Macri beschrieben wurde, kann maximale Schirmdurchmesser von 35 cm erreichen. Diese auch mit dem Trivialnamen „Spiegeleiqualle“ bezeichnete Meduse gehört zu den farbenprächtigsten Quallen im Adriatischen, Ägäischem und Mittelmeer und kommt häufig in Schwärmen vor<sup>[8]</sup>. *Cassiopeia andromeda* (Forsskal, 1775), im englischen Sprachgebrauch auch *upside-down jellyfish* genannt, lebt bevorzugt im Flachwasser bis zu 5 m Wassertiefe an den Küsten der Philippinen und Hawaiis. Im Gegensatz zu den meisten Medusen liegt sie mit ihrem Schirm (Durchmesser maximal 30 cm) auf sandigem Grund<sup>[213, 214]</sup>.

In norwegischen Fjorden und bis zu 7000 m Tiefe findet man *Periphylla periphylla* (Péron & Lesueur, 1810), die bis zu 30 cm groß werden kann und zur Biolumines-

zenz fähig ist. Während der Nahrungssuche steigt sie nachts auf der Suche nach Plankton in höhere Wasserschichten<sup>[215, 216]</sup>.

Die Rhopalien aus den Quallenarten *Chrysaora hysoscella* (Semaeostomeae), *Cotylorhiza tuberculata* (Rhizostomeae) und *Cassiopeia andromeda* (Rhizostomeae) wurden auf das Statolithenmineral hin untersucht. Die diesbezüglich bereits untersuchten Rhopalien von *Periphylla periphylla* (Coronata)<sup>[206]</sup> dienten zur Analyse des prinzipiellen Aufbaus.

### 3.3.1.1 Experimentelle Vorgehensweise

Die für die Untersuchungen benötigten Rhopalien und Statolithen wurden von den Kooperationspartnern (H. Tiemann, I. Sötje) aus den Quallen extrahiert und in 80%igen Ethanollösungen aufbewahrt. Kristalle für die Einkristalldiffraktometrie wurden in Cyanacrylattropfen (UHU) eingeschlossen und an Kohlefäden befestigt. Zur Phasenbestimmung wurden die Rhopalien ungemörsert auf einen Folienträger (Kapton) gegeben und in Transmission am HASYLAB mittels hochauflösender Pulverdiffraktometrie untersucht.

So genannte Kavitäten (Hohlräume in der Kristallmitte), die im hochauflösenden Lichtmikroskop beobachtet wurden, wurden sowohl mittels FIB an einzelnen Statolithen als auch im ESEM an eingebetteten Rhopalien untersucht. Für die ESEM-Untersuchung wurde eine in Epoxidharz (Araldite CY212) eingebettete Probe trocken am Mikrotom schichtweise abgetragen. Jede frische Schnittfläche wurde im ESEM betrachtet.

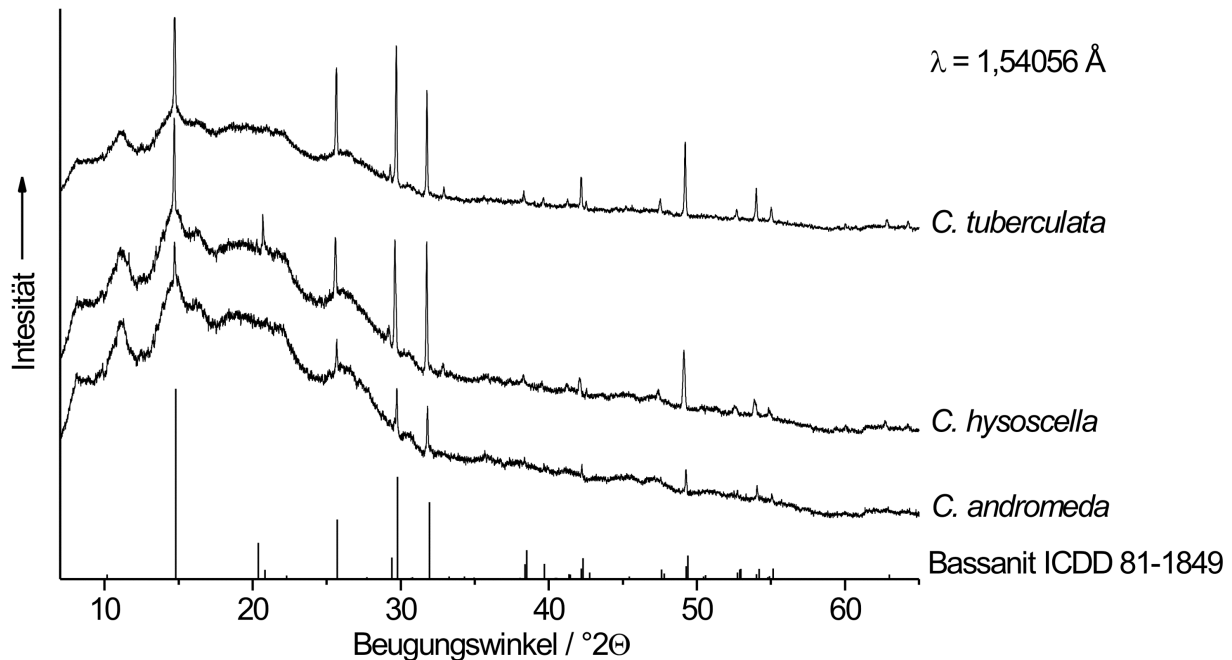
Ebenso wurden Schnitte aus eingebetteten Proben am Mikrotom für die Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) gefertigt. Um das Auflösen der Kristalle in Wasser zu vermeiden, wurde stattdessen mit Ethylenglykol ( $C_2H_4(OH)_2$ ) gearbeitet, welches durch nachträgliche Vakuumbehandlung wieder entfernt wurde (s. u.).

Die gefertigten Schnitte wurden im TEM untersucht und die gefundenen Kristallbruchflächen mittels EDX analysiert. Zudem wurde von größeren Flächen ein Elektronenbeugungsbild aufgenommen, um die kristallographische Orientierung zu ermitteln und das Material eindeutig zu charakterisieren.

### 3.3.1.2 Ergebnisse und Diskussion

Mit der Charakterisierung der mineralischen Substanz der Rhopalien werden die Arbeiten von B. Hasse<sup>[217]</sup> und A. Becker<sup>[13]</sup> in Kooperation mit I. Sötje und

H. Tiemann fortgeführt. Die in Abbildung 3.3.3 dargestellten Pulverdiffraktogramme der analysierten Proben zeigen gute Übereinstimmung im Vergleich mit dem Datenbankeintrag der ICDD von Bassanit.



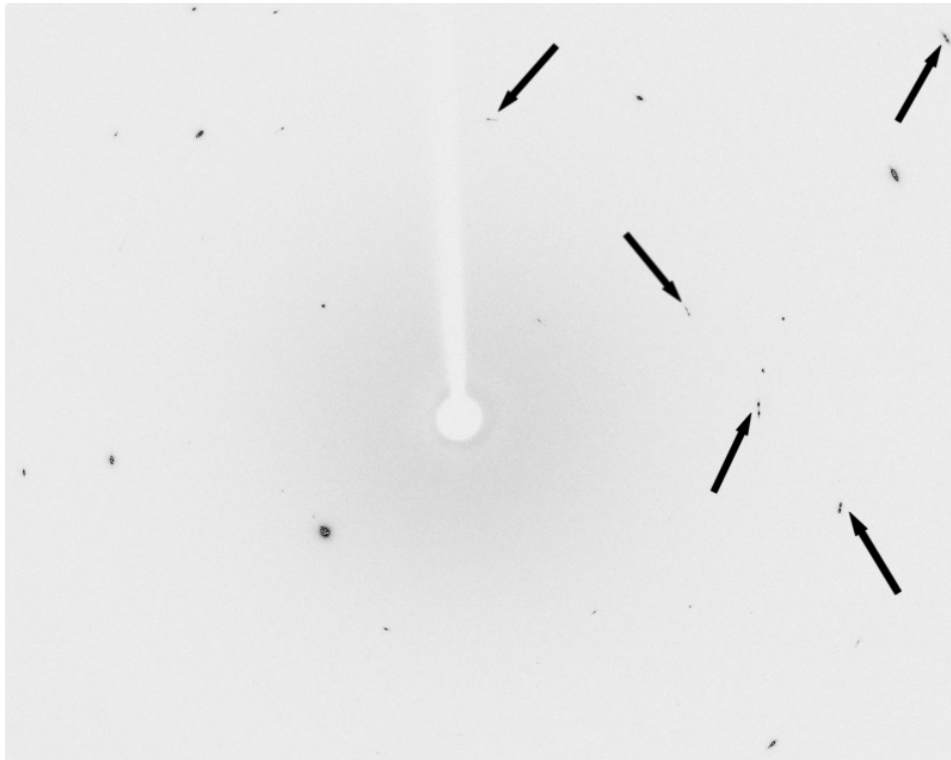
**Abb. 3.3.3:** Synchrotron-Pulverdiffraktogramme von Statolithen der untersuchten Spezies. Die identifizierten Reflexe stimmen mit denen der unten gezeigten ICDD-Referenz von Bassanit überein. Die Daten wurden in die Wellenlänge von Cu-K $\alpha$ -Strahlung ( $\lambda = 1,54056 \text{ \AA}$ ) konvertiert.

Die unterschiedlich starken Intensitäten der einzelnen Proben untereinander sind auf die unterschiedliche Anzahl der für die Messung zur Verfügung stehenden Rhopalien zurückzuführen. Zudem ist bei der Präparation nicht immer klar, wie viel mineralische Substanz abhängig vom Entwicklungsstand im einzelnen Rhopalium vorliegt. Die zu beobachtenden Intensitätsunterschiede zwischen den einzelnen Reflexen im Vergleich zum Datenbankeintrag sind durch die Vorzugsorientierung der ungemörserten Rhopalien bedingt.

Um auszuschließen, dass es sich bei dem analysierten Material um das strukturähnliche Anhydrit-III handelt, wurden Einkristalldiffraktogramme von einzelnen Statolithenkristallen der drei Quallenarten aufgenommen.

Die Abbildung 3.3.4 zeigt exemplarisch für alle Messungen auf einem Beugungsbild, dass es sich um kristalline Substanzen handelt. Zudem wird anhand einiger nah beieinander liegender Reflexe ebenso deutlich, dass der Kristall verzwilligt vorliegt

und bedingt durch die geringe Größe der Kristalle (10-60  $\mu\text{m}$ ) nur wenige Beugungsreflexe beobachtet werden konnten.



**Abb. 3.3.4** Hochauflösende Beugungsaufnahme eines Statolithenkristalls von *C. tuberculata*. Deutlich sind mehrere Reflexe zu erkennen, die verdoppelt vorliegen (Pfeile) und auf eine Zwillingstruktur hinweisen.

Obwohl mehrere Kristalle jeder Art untersucht wurden, konnte lediglich eine Indizierung der Daten vorgenommen werden. Die Lösung der Einkristallstruktur war unter diesen Umständen nicht möglich. In Tabelle 3.3.2 sind die aus der Indizierung resultierenden Gitterparameter von *C. hysoscella* und *C. tuberculata* aufgeführt.

**Tab. 3.3.2:** Durch Indizierung der Daten der Einkristalldiffraktometrie gewonnene Kristallstrukturparameter der untersuchten Quallenstatolithen

Probe	Gitterparameter / Å	Winkel / °
<i>C. tuberculata</i>	$a=6,94$ $b=12,02$ $c=12,75$	$\alpha=89,97$ $\beta=90,03$ $\gamma=89,98$
<i>C. hysoscella</i>	$a=6,38$ $b=c=6,96$	$\alpha=120,03$ $\beta=90,12$ $\gamma=89,87$

Im Rahmen der Messgenauigkeit sprechen die Gitterkonstanten und Winkel des Kris-

talls von *C. tuberculata* für ein monoklines System, während *C. hysoscella* scheinbar eine hexagonale Struktur aufweist. Da die Lösung der Einkristallstruktur aufgrund der verzwilligten Strukturen nicht durchführbar war, ist eine genaue Zuordnung der vorliegenden Phase nicht möglich. Bedingt durch die stark verzwilligten Kristalle und den daraus resultierenden Datensätzen, war eine Indizierung der Einkristalldaten von *C. andromeda* überhaupt nicht möglich.

Festzuhalten ist, dass die vorliegenden Daten eindeutig gegen Gips als Biomineral sprechen. Das Vorhandensein von Anhydrit-III ist aufgrund der bereits vollständig charakterisierten Statolithen anderer Scyphomedusen unwahrscheinlich. Die schnelle Umwandlung von Anhydrit-III in Bassanit bei geringer Feuchte spricht ebenso gegen das Vorkommen dieser Anhydritstufe in den untersuchten Statolithen.

Die hier weitergeführten Untersuchungen zeigen, dass das vorherrschende Biomineral in den Statocysten der Rhopaliophora Bassanit ist. Vergleicht man seine Dichte mit der von Gips (vgl. Tab. 3.3.1), so fällt der Unterschied von 0,31-0,45 g cm<sup>-3</sup> zu Gunsten der höheren Dichte von Bassanit auf. Führt man zudem eine Auftriebskorrektur (Subtraktion der Wasserdichte von 1 g cm<sup>-3</sup>) durch, so ist die Dichte von Bassanit um ein Drittel höher als die des Gipses. Physiologisch betrachtet ist Bassanit somit sensibler für Positionsänderungen als Gips.

Die Verwendung von CaSO<sub>4</sub> als Schweresinnesorgan beinhaltet zudem eine weitere Information bezüglich der Evolution. Fossile Funde datieren die Entstehung der Cnidaria ins späte Präkambrium (älter als 570 Millionen Jahre). Bis heute sind die phylogenetischen Verwandtschaftsbeziehungen im Unterstamm der Tesserazoa nicht vollständig geklärt. Die Scyphozoen werden als urtümlichste Klasse angesehen<sup>[218-221]</sup>, in der die Coronatae die fundamentale Rolle in der Entwicklung spielen<sup>[221, 222]</sup>. Viele Spezies dieser Ordnung sind Tiefseeorganismen. Da sich Calciumcarbonat bedingt durch den in diesen Tiefen herrschenden Druck auflöst (unterhalb von 4000-5000 m)<sup>[223]</sup>, ist es als Biomineral in Statocysten dieser Organismen ungeeignet. Sollte sich die erste Medusengeneration unter diesen Bedingungen entwickelt haben, dann könnte dies der Grund für die Verwendung von Bassanit als Mineral sein.

Um das Verständnis der Kristallbildung in den Statocysten zu vertiefen, wurden strukturelle Analysen an Schnittpräparaten im TEM durchgeführt. Bedingt durch die Verfügbarkeit und die bereits an dieser Art durchgeführte Forschung wurden Rhopalien von *Periphylla periphylla* untersucht. Für diese Untersuchungen wurden die

Rhopalien in verschiedene Epoxidharze eingebettet. Da  $\text{CaSO}_4$  nur als Anhydrit wasserunlöslich ist, in den Rhopalien aber als Bassanit vorliegt, musste ein geeignetes Medium für die Ultradünnschnitte gefunden werden, auf dem diese bei der Schneideprozedur am Mikrotom aufschwimmen und sich nicht auflösen. Nach Versuchen mit 80 %, und 90 %igen Ethanol-Wassergemischen, in denen sich die Kristalle bedingt durch die angeschnittene umgebende Membran schnell auflösten, waren Dünnschnitte auf Ethylenglykol ( $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}_2$ ) möglich. Allerdings war es nicht möglich, mit einem bei Schnitten auf Wasser üblichen Meniskus zu arbeiten, da sich die Schnitte aufrollten oder anderweitig kollabierten. Entsprechend wurde die Wanne des Diamantmessers nur bis kurz unter den Rand befüllt.

Zur Entfernung des Ethylenglykols wurden die Dünnschnitte auf TEM-Gitterchen gesammelt, auf Filterpapier gegeben und über Nacht im Vakuum getrocknet.

Um die Gefahr eines Bruches der Kristalle beim Schneiden zu minimieren, mussten Einbettmedien mit Härten ähnlich denen der Kristalle verwendet werden.

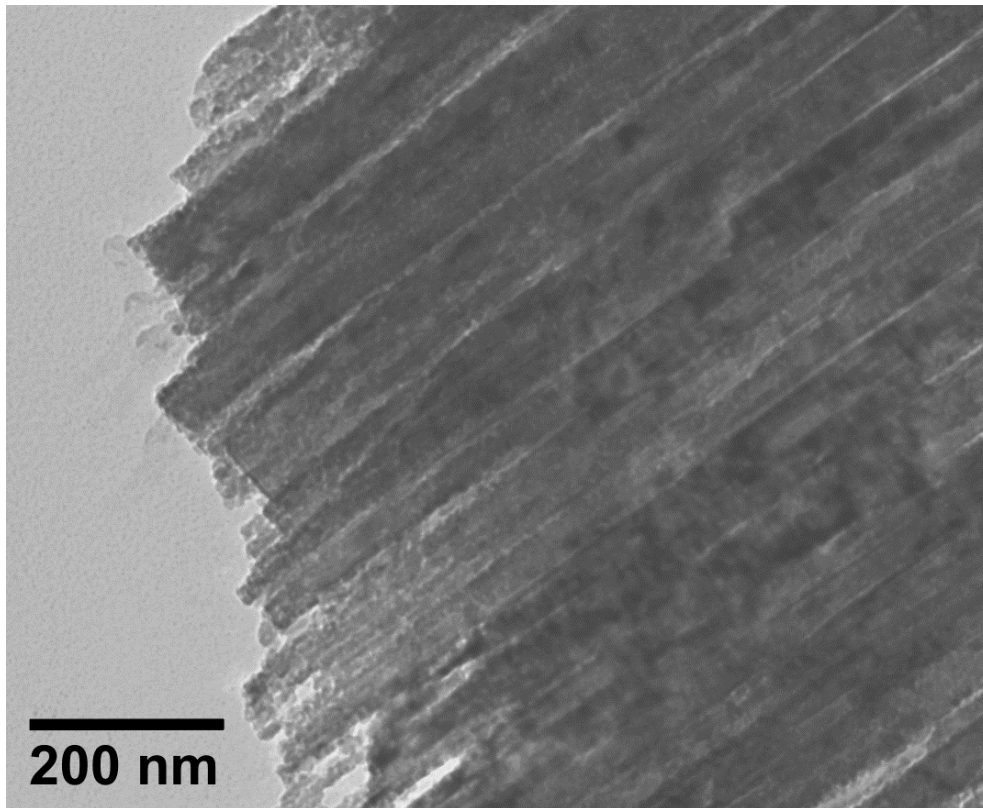
Das Epoxidharz nach Spurr<sup>[64]</sup> durchdrang das umgebende Zellgewebe sehr gut und einheitlich, war aber selbst in seinem höchsten Härtegrad noch zu weich, so dass die Kristalle herausbrachen. Weitere Einbettversuche wurden mit verschiedenen Härtegraden des Epoxids Araldite CY212 unternommen. Ansätze mit geringer Härte infiltrierten das Probenmaterial sehr gut, waren aber noch immer zu weich im Vergleich zur Kristallhärte. Mit steigendem Härtegrad stieg zugleich die Viskosität des Epoxids vor der Polymerisation, so dass das Zellmaterial nicht durchgängig infiltriert wurde. Zur Lösung des Problems wurde eine Verdünnungsreihe von hochviskosem Araldite in Ethanol mit steigendem Aralditegehalt (50 %, 70 %, 100 %) angesetzt. Das einzubettende Rhopalium wurde in einem Rotator bei stetiger Durchmischung zwölf- bis achtundvierzig Stunden in den einzelnen Verdünnungsstufen infiltriert.

Leider zeigte diese Behandlung keine bessere Infiltration der Probe mit dem Epoxid, so dass zusätzlich noch eine sechsstündige Verweilzeit in reinem, hochviskosen Araldite im Vakuum angeschlossen wurde. Eine bessere Durchdringung des Probenmaterials war zu beobachten, allerdings reichte die Verweilzeit von sechs Stunden im Vakuum nicht aus, um durchgängig eingebettete Proben zu erhalten.

Daraus resultierend konnten bisher nur Spurr-Schnitte untersucht werden, die nur Bruchstücke von Statolithen aufwiesen.

Die in der TEM-Aufnahme (Abb. 3.3.5) sichtbare Bruchkante eines Kristalls zeigt einen scheinbar stäbchenförmigen Aufbau. Die einzelnen parallel ausgerichteten

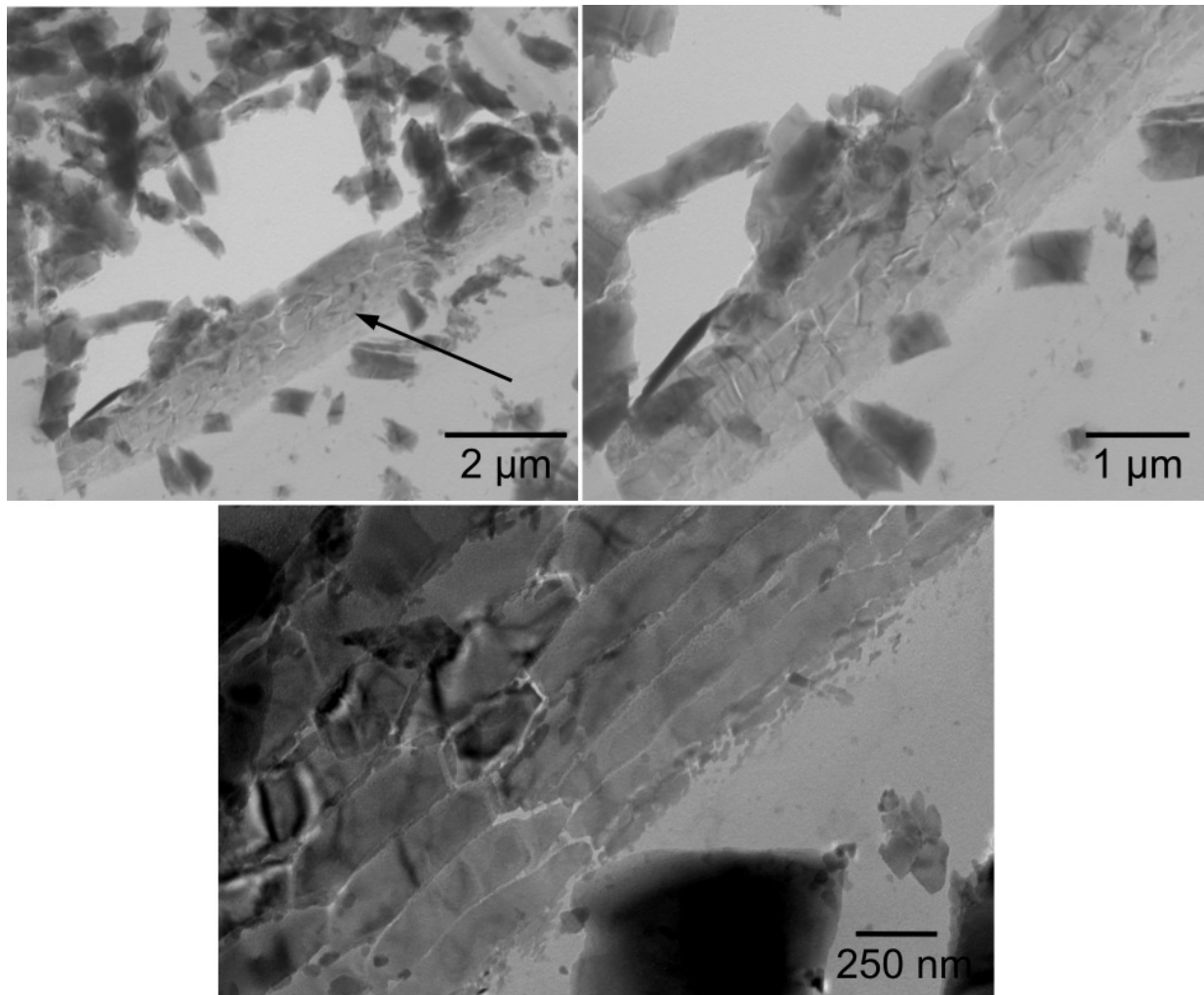
Fasern haben Breiten zwischen 50-100 nm. Bruchartefakte sind in dieser parallelen Ausrichtung und den relativ konstanten Breiten eher unwahrscheinlich.



**Abb. 3.3.5:** TEM-Aufnahme einer Kristallbruchkante eines Statolithen von *P. periphylla*. Die Schnittdicke betrug 100 nm. Der Kristall besteht aus parallel ausgerichteten Stäben mit Breiten zwischen 50-100 nm.

In Abbildung 3.3.6 sieht man die Überreste eines Statolithen in einem Schnitt von 100 nm Dicke. Die heraus gebrochenen Stücke sind über das gesamte Bild verteilt und mischen sich mit Bruchstücken anderer Kristalle. Dennoch ist am Rand des Einbettmediums eine etwa 1,7  $\mu\text{m}$  breite Randschicht des Kristalls zu erkennen. Höhere Vergrößerungen zeigen Kompartimente, die zum Rand des Einbettmediums hin kleiner werden. Obwohl man Bruchartefakte bedingt durch den Schnitt nicht ausschließen kann, sind diese hier eher unwahrscheinlich, da die kleineren Partikel den gleichen Kontrast wie die größeren im Kristall aufweisen. Diese Aufnahmen liefern erste Hinweise, dass die Statolithen aus einzelnen mineralgefüllten Kompartimenten aufgebaut sind, die sich parallel zueinander anordnen. Elektronenbeugungsaufnahmen identifizieren das Material eindeutig als Bassanit.





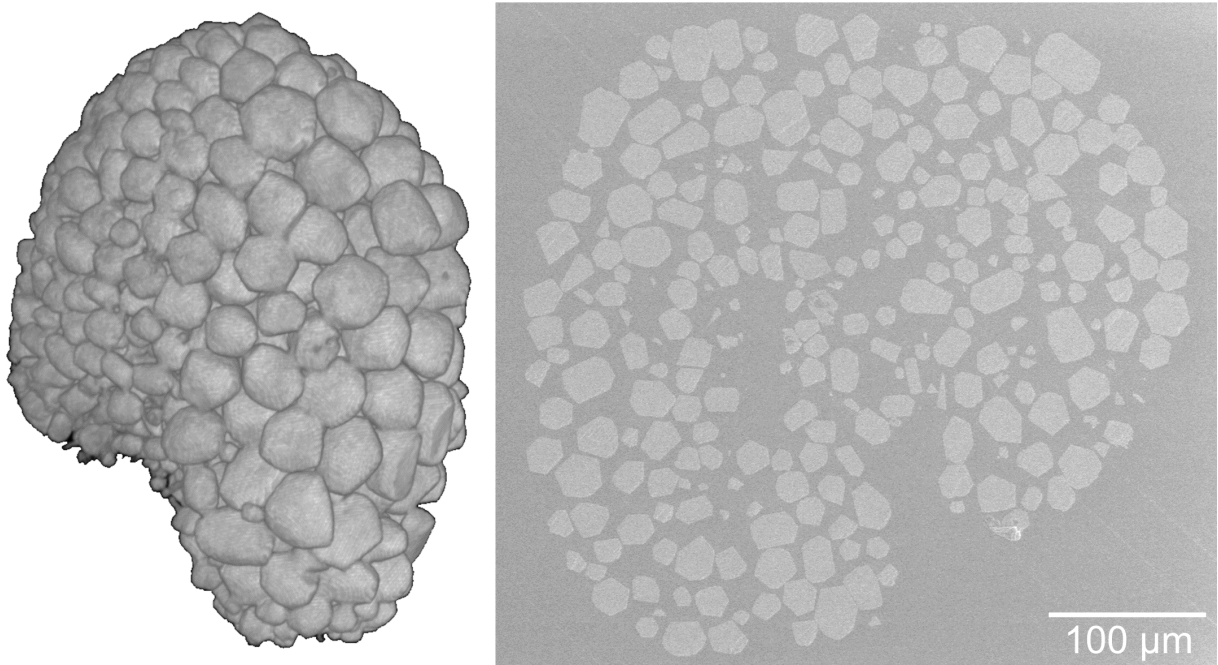
**Abb. 3.3.6:** TEM-Aufnahme eines 100 nm Dünnschnitts eines Rhopaliums von *P. periphylla* in Spurr bei 120 keV. In der Übersicht (oben links) sind Bruchstücke und eine am Rand erhaltene ca. 1,7 µm breite Kristallschicht (Pfeil) zu sehen. Die Vergrößerung (oben rechts) zeigt den Übergang zwischen Mineral und Einbettmedium. Die maximale Vergrößerung (unten) lässt einzelne Kristallite sichtbar werden.

Diese Präparationsmethode führt demzufolge nicht zu einer Umkristallisation während der Probenpräparation. Mit geeigneten Einbettmaterialien ist die Charakterisierung an Schnitten im TEM prinzipiell denkbar. An erfolgreichen Schnitten ist die Untersuchung verschiedener Bereiche innerhalb des Kristalls mit hochauflösender TEM durchführbar. Neben einer möglichen anderen Kristallstruktur im Bereich der vermuteten Kavitäten könnte auch die Zwillingsbildung erklärt werden.

Zusätzlich gestattet das vorliegende System die Untersuchung der Umkristallisation von Bassanit in Gips. Untersuchungen der Netzebenen des Statolithenkristalls an einem Dünnschnitt müssten dafür nach erfolgter Umkristallisation an Luft erneut im TEM untersucht werden. Anhand von Elektronenbeugungsaufnahmen könnte die

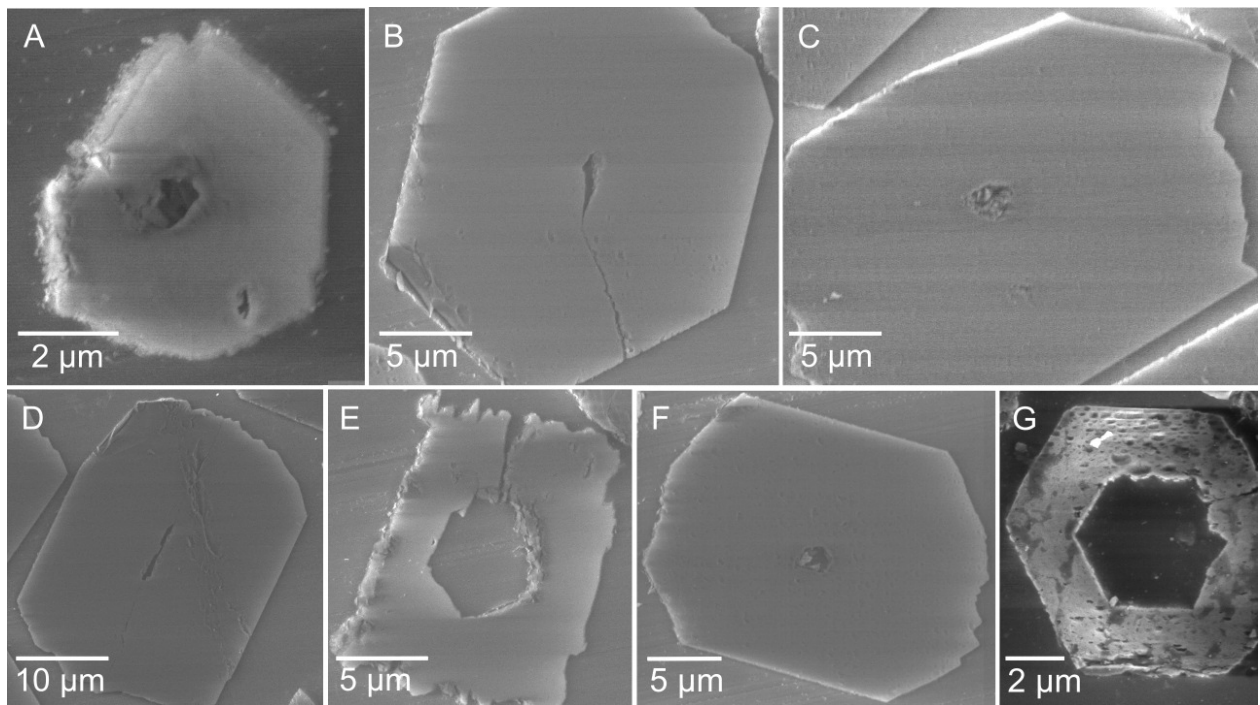
vorliegende Phase analysiert und ein möglicher Umbau der Netzebenen von Bassanit zu Gips verfolgt werden. Ein Lösungsansatz für eine bessere Einbettung ist die Verwendung von Technovit® 9100 (EMS). Dieses Einbettmaterial wird bei der Untersuchung von Implantaten in Knochengewebe genutzt. Da auch Titanimplantate in diesem Medium gut zu schneiden sind, ist die Härte ausreichend für die Statolithenkrystalle. Polymerisationszeiten von 6 Wochen ermöglichen zudem eine längerfristige Vakuumbehandlung zur Verbesserung der Infiltration der Proben.

Da bisher keine Schnitte mit intakten Kristallen möglich waren, sollte eine Untersuchung im ESEM an stückweise abgetragenen Rhopalien durchgeführt werden, um mögliche Kavitäten nachzuweisen. Um ein Auflösen der Kristalle im Kontakt mit dem Meniskus zu vermeiden, wurden die in Araldite eingebetteten Rhopalien trocken am Mikrotom mit einem Diamantmesser abgetragen. Die sich direkt aufrrollenden Schnitte wurden verworfen und das verbleibende Rhopalium ins ESEM überführt. In Abbildung 3.3.7 sieht man zunächst neben einer der Übersicht dienenden  $\mu$ CT(Mikrocomputertomographie)-Aufnahme eines Rhopaliums von *Aurelia aurita* die REM-Aufnahme einer Schnittfläche eines eingebetteten Rhopaliums von *P. periphylla*.



**Abb. 3.3.7:** Mikrotomographische Aufnahme ( $\mu$ CT, Seitenansicht) eines intakten Rhopaliums der Meduse *Aurelia aurita* (links)<sup>[207]</sup> und ESEM-Aufnahme eines Schnitts durch ein eingebettetes Rhopalium von *P. periphylla* (rechts).

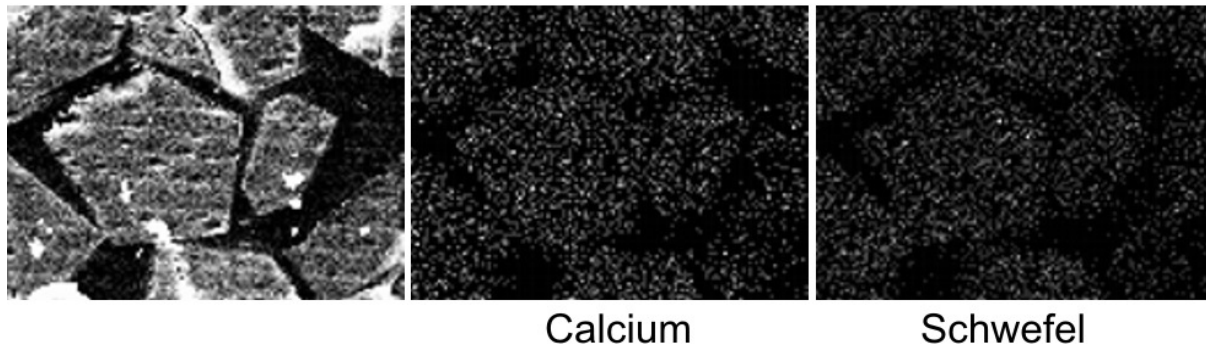
Deutlich sind die morphologischen Ähnlichkeiten zwischen dem Schnitt und der dreidimensionalen Abbildung zu erkennen. In den Präparaten konnten zudem über mehrere Schnitte (Schnittdicke 300 nm) auf einer Gesamthöhe von 10  $\mu\text{m}$  14 verschiedene Kavitäten mit Durchmessern von ca. 5  $\mu\text{m}$  beobachtet werden, von denen sieben in der Abbildung 3.3.8 exemplarisch dargestellt sind.



**Abb. 3.3.8:** ESEM-Aufnahmen von sieben verschiedenen Kavitäten in Statolithenkristallen eines Rhopaliums von *P. periphylla*. Besonders in E und G fällt die hexagonale Struktur der Kavität auf.

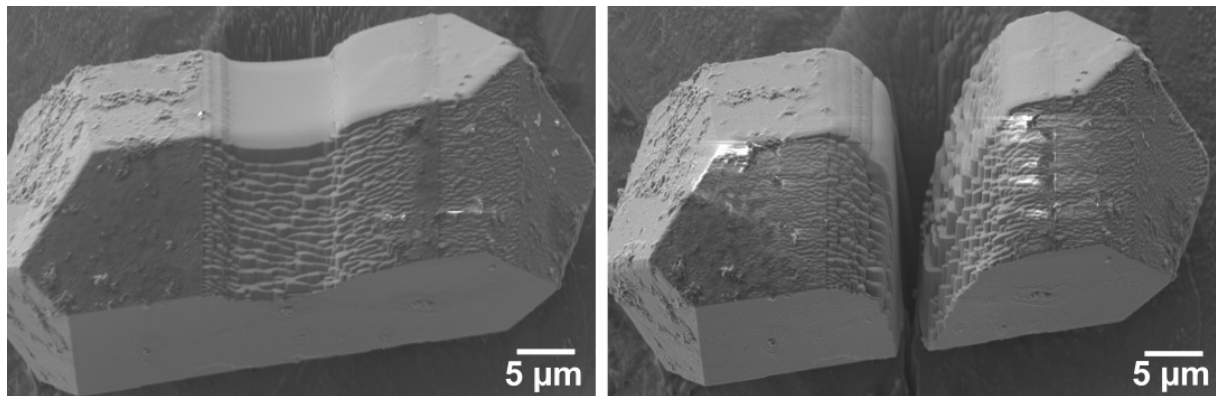
Besonders bei Abb. 3.3.8-E und G fällt die hexagonale Struktur der Kavität auf. Diese Kavität ist zudem mit Epoxid gefüllt, welches während des Einbettens durch einen Riss eindringen konnte. Somit kann ausgeschlossen werden, dass es sich bei den im Zentrum der Kristalle befindlichen Strukturen um Präparationsartefakte handelt.

EDX-Mapping-Aufnahmen dieser Schnittpräparate zeigten (Abb. 3.3.9) die Gleichverteilung von Calcium und Schwefel in den einzelnen Kristallen und bestätigten somit den homogenen Aufbau der Bassanitkristalle.



**Abb. 3.3.9:** Aufnahmen der EDX-Spektren der Statolithenkristalle mittels Mappingfunktion. Links ist der zu analysierende Ausschnitt als REM-Bild dargestellt. Die EDX-Analyse dieses Ausschnitts mit dem Fokus auf Calcium (Mitte) bzw. Schwefel (rechts) zeigt anhand der weißen Punkte die Verteilung der gemessenen Elemente.

Um die Befunde der Kavitäten zu verifizieren, wurde in Kooperation mit H. Fabritius und D. Raabe ein Statolith mit Hilfe des FIB (*focussed ion beam*) mit einem  $\text{Ga}^+$ -Ionenstrahl sowohl in der Mitte schrittweise durchtrennt (Abb. 3.3.10) als auch vom Ende her abgetragen.

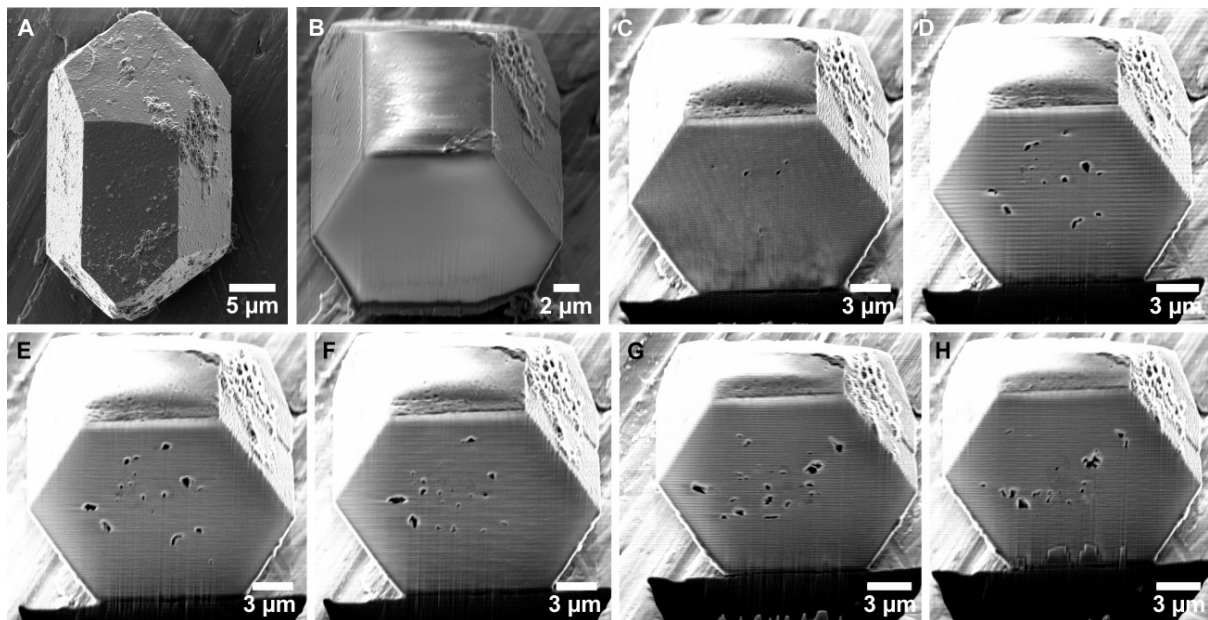


**Abb. 3.3.10:** REM-Aufnahmen verschiedener Stadien eines mittels FIB durchtrennten Statolithen.

Dabei wird die Probenoberfläche in hoher Geschwindigkeit grob mit dem Ionenstrahl abgerastert, um abschließend mit einer sehr niedrigen Rastergeschwindigkeit geglättet zu werden. Die Schnittdicke betrug ca.  $1\ \mu\text{m}$  (120 s pro Schicht mit 500 pA). Bei den Untersuchungen konnte keine Kavität im Kristallzentrum entdeckt werden. Stattdessen waren mehrere über die Schnittfläche verteilte poröse Strukturen sichtbar, die maximale Durchmesser von  $2\ \mu\text{m}$  und Längen wenige Mikrometer erreichten. Auffallend bei der Analyse im FIB war, dass diese kleinen Löcher nur in der Mitte des untersuchten Kristalls auftraten und zu den Enden hin wieder verschwanden.

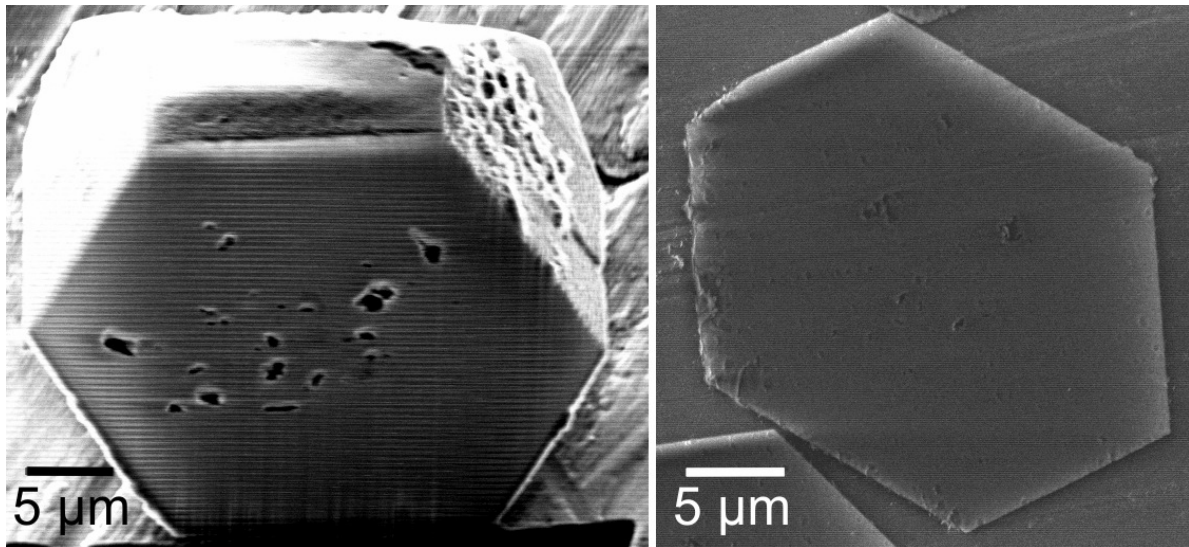
Zudem war jedes gefundene Loch in Form eines Schlauches aufgebaut, der zu seinen Enden hin kleiner wurde.

Diese Löcher waren bereits bei den Untersuchungen im ESEM aufgefallen, aber als Präparationsartefakte aufgefasst und somit nicht berücksichtigt worden. In Abbildung 3.3.11 ist ein Statolith in verschiedenen Stadien gezeigt, der mittels FIB abgetragen wurde. Die auf der Oberfläche anhaftenden Strukturen sind auf Reste der anhaftenden organischen Matrix zurückzuführen (Abb. 3.3.11-A). Zu Beginn und zum Ende des Kristalls waren auf den Schnittflächen keine porösen Strukturen zu finden (Abb. 3.3.11-B). Im weiteren Verlauf der Schnitte zeigten sich löchrige Strukturen, die zur Mitte hin (Abb. 3.3.11-G) in ihrer Anzahl und Größe zunahmen und zum Kristallende hin (Abb. 3.3.11-H) wieder abnahmen.



**Abb. 3.3.11:** REM-Aufnahmen verschiedener Schnittstadien eines Statolithen Kristalls, der mittels FIB abgetragen wurde. A: Kristall vor der FIB-Behandlung. B: Schnittfläche ohne Löcher. C: beginnende Lochstruktur. D-F: drei aufeinander folgende Schnitte in der Kristallmitte. G: maximal zu beobachtende Porosität. H: Abnahme der Porosität zum Kristallende hin.

In Abbildung 3.3.12 sind die Schnittflächen eines Statolithen nach FIB-Behandlung und ähnliche poröse Strukturen, die bei den Schnitten im ESEM aufgefallen waren, vergleichend gegenübergestellt.



**Abb. 3.3.12:** Poröse Strukturen in Statolithen von *P. periphylla*, die im FIB (links) und im ESEM (rechts) gefunden wurden.

Da der Kristall im FIB komplett abgetragen wurde, muss man davon ausgehen, dass in diesem keine Kavität vorlag. In den Schnittpräparaten, die im ESEM charakterisiert wurden, konnte auf einer Strecke von 10 µm nicht in jedem angeschnittenen Kristall eine Kavität nachgewiesen werden. Gleiches traf auf die porösen Strukturen zu.

Während die porösen Strukturen eher auf Fehlstellen beim Kristallaufbau hindeuten, bleibt die Frage offen, welche Funktion den hexagonalen Kavitäten zukommt.

Ihre Größe und die ungleichmäßige Verteilung in den einzelnen Kristallen eines Rhopaliums widersprechen der bisherigen Annahme eines organischen Kristallisationskeims. Zudem konnten in den untersuchten Rhopalien auch Kristallite mit Gesamtdurchmessern unter 5 µm nachgewiesen werden, die keinen Kristallisationskeim bzw. keine Kavität im Inneren zeigten.

Es ist bisher nicht möglich, das Vorkommen und die Lage der Kavitäten in einen sinnvollen Zusammenhang zu stellen. In der Literatur wird derzeit über die Kombination von freien Additiven in Lösung und einer festen Kristallisationsmatrix diskutiert, die zur Bildung amorpher Kugeln führt. Diese kristallisieren nach kurzer Zeit zur Hohlkugel aus<sup>[224]</sup>. Sie werden von stabileren Phasen nach kurzer Zeit überwachsen und vergrößern sich. Der Radius einer solchen Hohlkugel liegt im System  $\text{CaCO}_3$  konstant zwischen 2-5 µm.

Ein ähnlicher Entstehungsprozess ist in den Rhopalien denkbar. Bedenkt man, dass die junge Meduse aus dem sessilen und somit statocystenfreien Polypen entsteht, so

muss innerhalb kürzester Zeit nach Strobilation (asexuelle Vermehrung) ein Schweresinnesorgan ausgebildet werden.

Die untersuchten Statolithen der Medusen sind von einer Membran umgeben<sup>[206]</sup>, die nach Zerstörung zu einer Umkristallisation bzw. zum Auflösen des Kristalls in normaler Luftfeuchtigkeit führt. Es ist denkbar, dass sich innerhalb dieser Membranen in der jungen Meduse amorphes Material sammelt, welches dann in kurzer Zeit zu Bassanit auskristallisiert und dabei eine Kavität ausbildet. Damit wäre für den gerade entstandenen Organismus direkt ein Schweresinnesorgan nutzbar, das mit der Zeit weiter wächst. Neu entstehende Statolithen könnten über längere Zeiträume auskristallisieren und bedürften keiner amorphen Vorstufe, weshalb sich nur in einigen Kristallen Kavitäten finden. Da der Entstehungsprozess in den jungen Medusen noch nicht aufgeklärt ist, sind weitere Hypothesen denkbar, die nur mit weiterer Forschung aufgeklärt werden können.

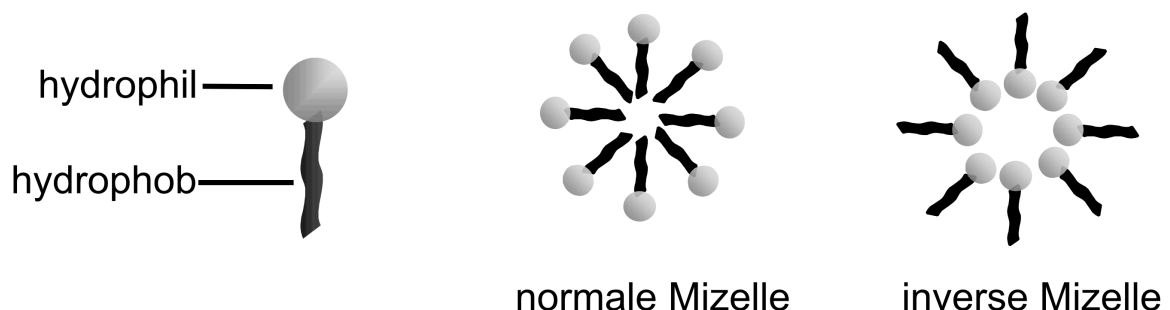
Die Untersuchungen haben gezeigt, dass die neu charakterisierten Rhopalien alle aus Bassanit aufgebaut sind. Bedingt durch die Fülle der Daten der letzten Jahre<sup>[206-208]</sup> kann von der Annahme, Gips in den Statolithen zu finden, Abstand genommen und das Halbhydrat als Biomineral der Statolithen von Rhopaliphora postuliert werden. Die strukturellen Untersuchungen geben Hinweise auf eine in Kompartimenten stattfindende Kristallisation, die den Kristall schichtweise aufbauen. Offen bleiben die Ursache und der Nutzen der gefundenen Kavitäten. Eine Untersuchung mittels Computertomographie wäre im Prinzip sinnvoll, da so die Verteilung innerhalb eines Rhopaliums artefaktfrei bestimmt werden kann. Bedingt durch die Auflösungen bei den bereits in der  $\mu$ CT untersuchten Rhopalien kann aufgrund einer resultierenden Voxellänge (dreidimensionale Darstellung eines Pixels) von 1,5  $\mu$ m keine Analyse dieser Kavitäten stattfinden. Hochauflösende nanoCT-Aufnahmen von Rhopalien in verschiedenen Wachstumsphasen könnten bei der Aufklärung nützlich sein. Der Aufbau dieser Messmethode ist in den kommenden Jahren am Deutschen Elektronensynchrotron (DESY, Hamburg) geplant.

### 3.3.2 Kristallisation von Calciumsulfat in Mikroemulsionen

Das Ziel dieses Projektes war, inspiriert durch die in Kapitel 3.3.1.2 vorgestellten Ergebnisse, die Kristallisation von Bassanit. In der Literatur fanden sich keine Hinweise auf die gezielte Kristallisation von Bassanit, da es großtechnisch über die thermische Behandlung von Gips hergestellt wird<sup>[225, 226]</sup>. Da die Statolithen offenbar in Kompartimenten kristallisieren und Bassanit eine wasserarme Phase des Calciumsulfats ist, sollte für die Umsetzung die Mikroemulsionskristallisation herangezogen werden.

Über ersten Versuche zur Kristallisation von monodispersen Metall-Nanopartikeln in Mikroemulsionen wurde 1982 berichtet<sup>[227]</sup>. Die Kristallisation von  $\text{CaSO}_4$  wurde nach dieser Methode bereits realisiert, wobei das Augenmerk auf der Kristallmorphologie und der Partikelgröße lag. Die beschriebenen Produkte konnten bisher nur als Dihydrat (Gips) identifiziert werden<sup>[228, 229]</sup>. Die erfolgreiche Kristallisation von Bassanit wurde bisher noch nicht beschrieben.

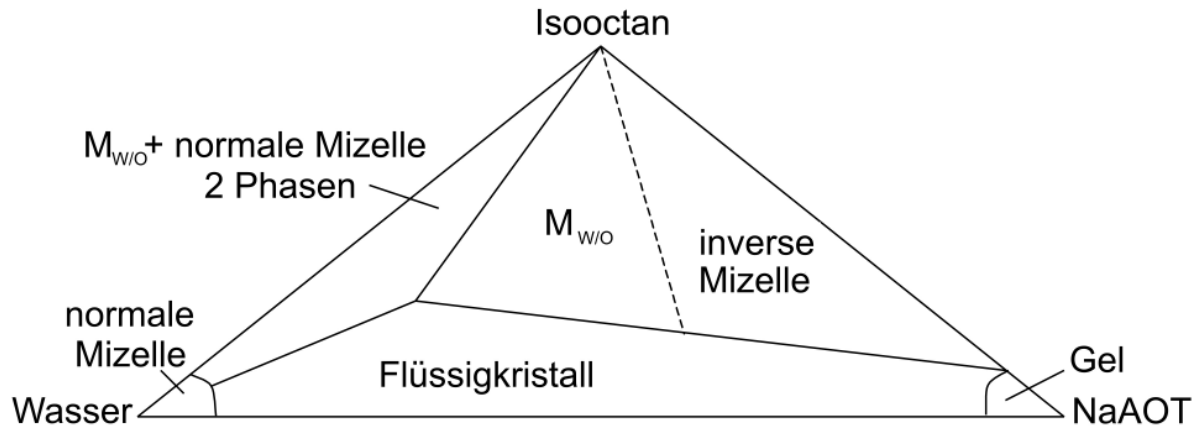
Um die vorliegenden Ergebnisse besser interpretieren zu können, soll ein kurzer Überblick über Mikroemulsionssysteme gegeben werden. Der Begriff Mikroemulsion wurde von I. Danielsson und B. Lindmann als ein System aus Wasser, Öl und einer amphiphilen Substanz definiert, welches in einer Phase als optisch isotrope und thermodynamisch stabile, flüssige Lösung vorliegt<sup>[230]</sup>. Um ein solches System zu stabilisieren, muss die Grenzflächenspannung zwischen der polaren und der unpolaren Flüssigkeit minimiert werden. Dies wird durch die Besetzung der Grenzfläche mit Tensiden möglich, so dass kein direkter Kontakt zwischen den beiden Phasen besteht. Es können normale oder inverse Mizellen vorliegen (Abb. 3.3.13).



**Abb. 3.3.13:** Schematische Darstellung von Mizellen. Die Unterscheidung zwischen normalen und inversen Mizellen wird anhand der Lage der hydrophilen Kopfgruppe getroffen.



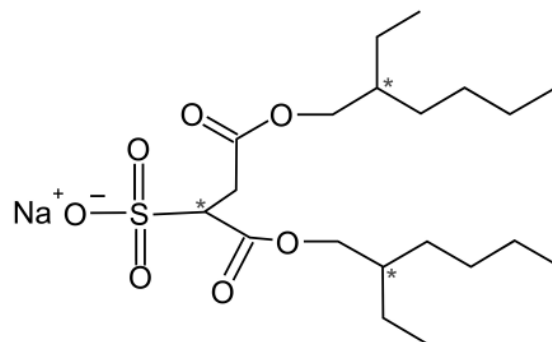
Welche Mizellen entstehen, hängt vom umgebenden Medium ab<sup>[231]</sup> und ist in Abbildung 3.3.14 anhand des vorliegenden Systems Wasser, Isooctan und Aerosol OT (AOT,  $C_{20}H_{37}O_4SO_3Na$ ) dargestellt.



**Abb. 3.3.14:** Phasendiagramm von NaAOT in Wasser und Isooctan. Die Ausbildung von inversen oder normalen Mizellen hängt von der umgebenden Phase ab.  $M_{w/o}$  – Wasser-in-Öl-Mikroemulsion.

NaAOT ist ein anionisches Tensid mit hydrophiler Kopfgruppe und hydrophobem Schwanz (Abb. 3.3.15), der sich zum Isooctan hin ausrichtet und so eine inverse NaAOT-Mizelle bildet.

I



**Abb. 3.3.15:** Strukturformel von NaAOT (Natrium 1,4-bis(2-ethylhexyl)sulfosuccinat). \* markiert die chiralen C-Atome.

In Wasser-in-Öl(w/o)-Mikroemulsionen wird die Zusammensetzung des Systems durch die Tensidkonzentration und das Wasser-zu-Tensid-Verhältnis  $w$  bestimmt (Gl. 3.17).

$$w = \frac{[\text{H}_2\text{O}]}{[\text{Tensid}]} \quad (3.17)$$

Bei konstantem Tensidgehalt findet man in erster Näherung bei nicht allzu großen Wassergehalten einen linearen Zusammenhang zwischen der Tropfengröße des Wasserkerns  $r_w$  (nm) und  $w$ , der mit Gleichung 3.18 einfach berechnet werden kann<sup>[232]</sup>.

$$r_w = 0,18 \cdot w \quad (3.18)$$

Dies trifft für eine Vielzahl von Systemen zu, in denen der Durchmesser zwischen 0,5-50 nm variabel einstellbar ist. In wasserarmen Systemen ( $w < 10$ ) sind die Mizellen entsprechend sehr klein, so dass das gesamte Wasser nur ausreicht, um die Kopfgruppen und Gegenionen des Tensids zu hydratisieren<sup>[232]</sup>.

Ein weiteres Charakteristikum von w/o-Mikroemulsionen ist der dynamische Charakter ihrer Mikrostruktur. Da die Mizellen kinetisch labil sind, besteht ein dynamischer Austauschprozess zwischen ihnen. Bei der Kollision einzelner Mizellen werden kurzzeitig Dimere gebildet, die ihren Inhalt austauschen können und schnell wieder in einzelne Mizellen zerfallen. Dieser Austauschprozess ist temperaturabhängig und hängt unter anderem von der Natur des verwendeten Tensids ab<sup>[233]</sup>.

Die Temperatur des Systems hat zudem einen Einfluss auf die Stabilität der Mikroemulsion. Verlässt man den optimalen Temperaturbereich, so kommt es zur Entmischung des Systems, die direkt durch eine Trübung der Flüssigkeit sichtbar wird. Die entstehenden Systeme können in drei verschiedene Multiphasensysteme nach Windsor<sup>[234]</sup> unterschieden werden, auf die hier nicht näher eingegangen werden kann.

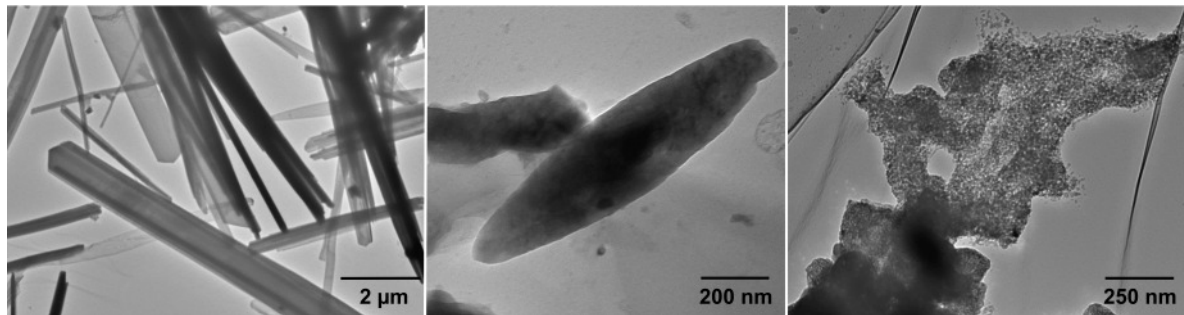
### 3.3.2.1 Experimentelle Vorgehensweise

Für die Kristallisation von Calciumsulfat wurde je eine 0,1 molare wässrige  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ -Lösung und eine  $\text{Ca}(\text{AOT})_2$ -Lösung (in Isooctan) in ein 0,1 molares NaAOT-Isooctangemisch gegeben. Die Versuche wurden mit Ionenverhältnissen von  $\text{Ca}^{2+}$  zu  $\text{SO}_4^{2-}$  von einhalb, eins und zwei als auch unterschiedlichen Wasser-zu-Tensid-Verhältnissen von  $w = [\text{H}_2\text{O}] : [\text{NaAOT}] = 3, 5$  und 10 durchgeführt. Nach dreitägiger

Kristallisationsdauer bei 20, 60 und 90 °C wurde der weißliche Niederschlag abzentrifugiert (Eppendorf 5415D; 45 °-Standardrotor, 6 min, 10.000 U min<sup>-1</sup>, entspricht ca. 7700 g) und mit Isooctan gewaschen. Die gereinigten Kristallisationsprodukte wurden im TEM untersucht. EDX-Analysen gaben Aufschluss über die Zusammensetzung des kristallisierten Materials. Elektronenbeugungsbilder wurden zur Phasenanalyse herangezogen.

### 3.3.2.2 Ergebnisse und Diskussion

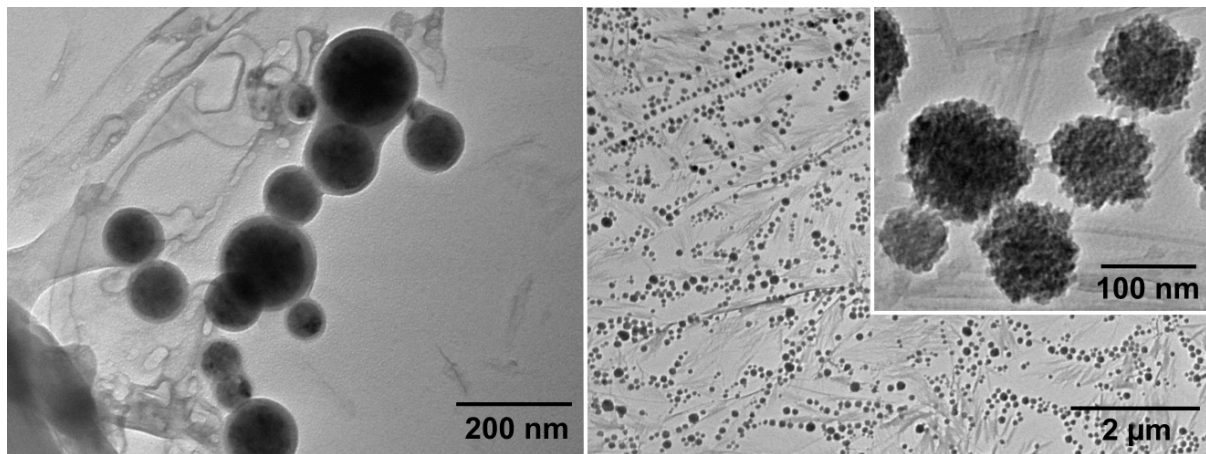
Bei den verwendeten w/o-Mikroemulsionen handelt es sich nach Gleichung 3.18 um Partikel mit Wasserkernradien von 0,54 nm ( $w = 3$ ) bis 1,8 nm ( $w = 10$ ). Zusammen mit der umgebenden Tensidschicht ergeben sich Mizellradien weniger Nanometer. Die nachgewiesenen Kristallisationsprodukte sind hingegen zwischen 100 nm bis zu einigen Mikrometern groß. Die TEM-Bilder zeigen dabei die verschiedensten Morphologien (Abb. 3.3.16).



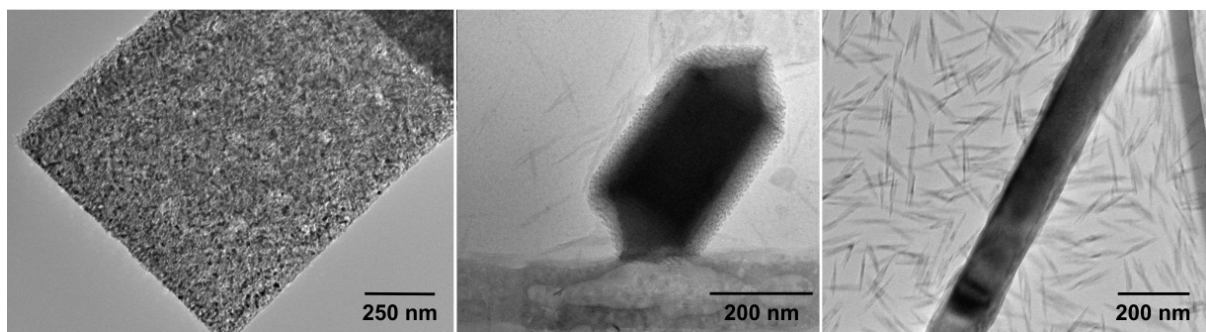
**Abb. 3.3.16:** Verschiedene TEM-Aufnahmen zur Übersicht über die entstandenen Kristallisationsprodukte der Mikroemulsionskristallisation bei 120 keV.

Neben dunkler erscheinenden, dichteren Kristallen, die einen stab- oder zigarrenförmigen Habitus aufweisen, finden sich auch kugelförmige Anordnungen (Abb. 3.3.17) und kleine Agglomerate, die gefüllte Mizellen erkennen lassen.

Besonders interessant ist, dass in elektronendichten Kristallen keine Mizellstruktur mehr zu sehen ist, gleiche Morphologien mit geringerer Elektronendichte hingegen an den Rändern noch Mizellen aufweisen. Einige Strukturen sind zwar bereits in der stabförmigen Morphologie angelegt, bestehen aber zur Gänze aus noch nicht vollständig gefüllten Mizellen. Führt man diese Ergebnisse zusammen, so kann man annehmen, das Kristallwachstum in verschiedenen Phasen aus einer Mikroemulsion beobachten zu können (Abb. 3.3.18).



**Abb. 3.3.17:** TEM-Aufnahmen kugelförmiger Kristallisationsprodukte, die bei 20 °C, doppelter Calciumkonzentration und  $w = 10$  (links) bzw. 90 °C, doppelter Sulfatkonzentration und  $w = 3$  (rechts) entstanden sind.



**Abb. 3.3.18:** TEM-Bilder verschiedener Präzipitate. Die zu einem Stab zusammengelagerten, nur teilweise gefüllten Mizellen (links) als auch der hexagonale, elektronendichten Kristall mit umgebenden Mizellen (Mitte) deuten verschiedene Stufen des Kristallwachstums in Mikroemulsionen an, aus denen elektronendichte Kristalle (rechts) entstehen.

Elektronenbeugungsaufnahmen identifizieren die meisten Präzipitate als Mischungen aus Bassanit und Gips. In Tabelle 3.3.3 sind diejenigen Experimente aufgeführt, die nach Auswertung der Beugungsaufnahmen als einphasige Systeme identifiziert werden konnten.

Bemerkenswert ist die Tatsache, dass Konzentrationsverhältnisse von  $w = 5$  und  $w = 10$  bei 60 °C und 90 °C zur Ausbildung phasenreinen Bassanits führten. Da mit sehr geringen molaren Verhältnissen gearbeitet wurde, kann nur im Fall  $w = 10$  von „freiem“ Wasser in den Mizellen gesprochen werden.

**Tab. 3.3.3:** Zusammenfassung der ausgewerteten TEM-Bilder im Bezug zu den Beugungsdaten von Experimenten mit homogener Phasenausbildung

Pseudopolymorph	Temperatur / °C	Ca : SO <sub>4</sub>	Konzentrations- verhältnis	Morphologie
<b>Gips</b>	20	1 : 1	$w = 3$	dichtes Material, große Kristalle
		1 : 2		große, dichte Kristalle
	60	2 : 1	$w = 5$	Nadel- und Zigarrenstruktur, dichtes Material
	90	1 : 2	$w = 3$	homogene Kugeln
			$w = 10$	Agglomerate und zigarrenförmige Kristalle
<b>Bassanit</b>	60	1 : 1	$w = 5$	ovale Agglomerate
	90	1 : 1	$w = 10$	ovale Agglomerate
		1 : 2	$w = 5$	zigarrenförmige Kristalle, weniger dicht
		2 : 1	$w = 10$	nadelförmige und hexagonale Kris- talle

Entsprechend sind Systeme mit  $w = 3$  und  $w = 5$  nur an den Kopfgruppen des Tensids hydratisiert. Entgegen der aufgrund des geringen Wassergehaltes zu erwartenden Phasen Bassanit oder Anhydrit findet man Mischungen aus Gips und Bassanit vor. Die Stärke der Hydratisierung scheint demzufolge die Bildung von Bassanit weniger zu beeinflussen als die Temperatur und das Verhältnis von Calcium zu Sulfat. Im Allgemeinen zeigen die Ergebnisse, dass dichtes Material Gipskristallen entspricht, weniger dichtes Material und kleine Partikel hingegen aus Bassanit aufgebaut sind. Es ist zu vermuten, dass die Experimente, in denen beide Calciumsulfatphasen zu finden sind, die Transformation von Bassanit zu Gips zeigen. Hinweise geben kontrastreichere Aufnahmen von Nadelstrukturen oder Partikeln, die eindeutige Beugungsbilder von Gips zeigten. In derselben Probe zu findende Kristalle gleicher Morphologie, aber geringerer Elektronendichte, konnten hingegen als Bassanit identifiziert werden.

Besonders hervorzuheben sind die Ergebnisse bei 90 °C, einem Konzentrationsverhältnis von 10 und einer doppelten Calciumkonzentration, da hier nicht nur reiner Bassanit kristallisierte, sondern dieser zudem als Hexagon vorlag, wie es in den Rhopalien der Quallen der Fall ist.

Abschließend kann bestätigt werden, dass eine Kristallisation von Bassanit im beschriebenen Mikroemulsionssystem möglich ist. Da sich verschiedene Stadien des

Kristallwachstums identifizieren lassen, kann man davon ausgehen, dass die entstandenen Einkristalle sich aus gefüllten Mizellen zusammensetzen. Beugungsbilder und die daraus abgeleiteten  $d$ -Abstände der Kristalle zeigen keine Unterschiede zu den in der ICDD abgelegten Daten. Diese Ergebnisse fügen sich gut in das beschriebene Modell der Mesokristalle<sup>[19]</sup> von H. Cölfen und S. Mann ein.

Allgemein ist anzunehmen, dass die Temperaturerhöhung zu stärkerer Interaktion der einzelnen Mizellen untereinander führt. Es ist jedoch keine Abhängigkeit zwischen einer erhöhten Ausbildung von Dimeren bei höheren Temperaturen und der Kristallisation einer bestimmten Phase erkennbar. Auch die verschiedenen Ionenverhältnisse und die verwendeten Wasseranteile zeigen keinen Zusammenhang zur entstehenden Kristallphase. Das Verständnis, wie diese Parameter die Mizelloberfläche beeinflussen, um Strukturen, wie kugel-, zigarren- und nadelförmige als auch hexagonale Kristalle entstehen zu lassen, kann nur durch weitere Forschung erlangt werden.

Um die Aussagen über die Kristallphasen zu verifizieren, wären größere Ansätze notwendig, um die Phasenanalyse mit Pulverdiffraktogrammen zu bestätigen.

### 3.4 Eisen(II, III)-oxid

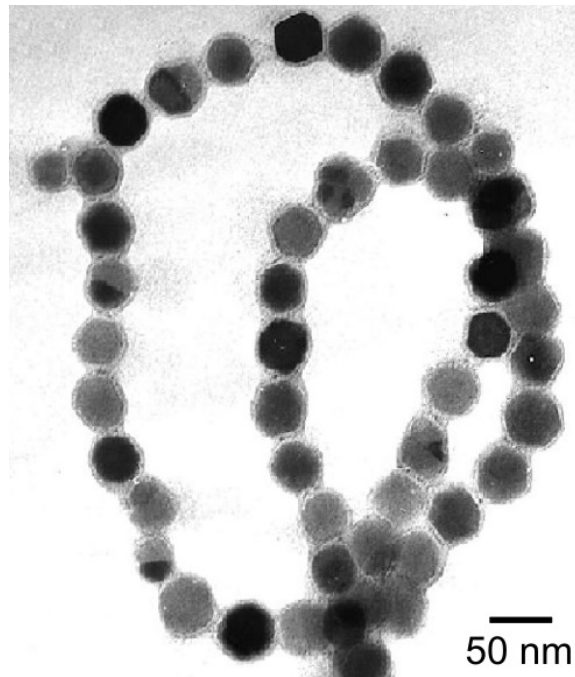
Eisen(II,III)-oxid (Magnetit,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) ist neben Eisen(II)-oxid (Wüstit,  $\text{FeO}$ ) und Eisen(III)-oxid (Hämatit,  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ) eines der drei Oxide des Eisens. Es ist ein aus  $\text{Fe}^{2+}$ - und  $\text{Fe}^{3+}$ -Ionen zusammengesetztes, ferrimagnetisches Oxid mit inverser Spinellstruktur, in der die Sauerstoffionen ( $\text{O}^{2-}$ ) eine kubisch-dichteste Packung einnehmen, während die  $\text{Fe}^{2+}$ -Ionen in den oktaedrischen Lücken sitzen. Die verbleibenden  $\text{Fe}^{3+}$ -Ionen verteilen sich je zur Hälfte auf oktaedrische und tetraedische Lücken. Durch Oxidation mit Sauerstoff entsteht aus Magnetit bei 200-300 °C Hämatit, welches an Luft unter Sauerstoffabspaltung bei 1200 °C wieder zu Magnetit reduziert wird.

Eisen(II)-oxid entsteht hingegen bei der Reduktion von  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  mit Wasserstoff und ist als nicht-stöchiometrische Verbindung nur oberhalb von 560 °C thermodynamisch stabil.

In der Industrie werden die Eisenoxide vor allem als Pigmente verwendet. Die Teilchengröße spielt eine wichtige Rolle: Durchmesser unter 10 nm sind transparent und können für Metallic-Lacke eingesetzt werden. Neben der Nutzung als Buntpigment werden sie für die Herstellung von Ton- und Videobändern genutzt<sup>[235, 236]</sup>.

Als Biomineral ist Magnetit in mehreren Organismen zu finden. Seine Härte nutzen einige Schnecken in ihren Radulae („Schneckenzähne“)<sup>[237]</sup>, während die magnetischen Eigenschaften von vielen verschiedenen Spezies der Hauptstämme des Tierreichs zur Orientierung im Erdmagnetfeld genutzt werden<sup>[7]</sup>. Sowohl in Lachsen<sup>[238]</sup> und Regenbogenforellen<sup>[239]</sup> als auch in Vögeln<sup>[240-242]</sup> finden sich Magnetitpartikel, vor allem im Kopfbereich. Im Schnabelgewebe von Tauben fand man beispielsweise nanopartikuläre, superparamagnetische Magnetitpartikel<sup>[243]</sup>.

In den späten 1970ern entdeckte man magnetotaktische Bakterien<sup>[244]</sup>, die sich anhand eines von außen angelegten Magnetfeldes orientieren. Dieser Begriff ist taxonomisch nicht relevant, sondern beschreibt eine heterogene Gruppe schwer kultivierbarer Bakterien, die nur über ihre Magnetotaxis vergleichend betrachtet werden können. Allerdings finden sich auch viele Gemeinsamkeiten in dieser Gruppe. Bisher sind alle Vertreter als Gram-negative, mittels Flagellen zur Fortbewegung fähige Bakterien identifiziert worden, die sich im Allgemeinen in hoher Anzahl in oder kurz unter der Grenze von sauerstoffhaltiger zu sauerstofffreier Schicht in wässrigen Habitaten aufhalten. In ihnen kann man 35-120 nm große, eisenhaltige Kristalle identifizieren, die von einer 3-4 nm dicken Membran umschlossen sind<sup>[245]</sup> und als Magnetosomen bezeichnet werden (Abb. 3.4.1).



**Abb. 3.4.1:** TEM-Bild einer Magnetosomenkette des Bakteriums *Magnetospirillum gryphiswaldense*. Deutlich sind die umgebenden Membranen an den Magnetitkristallen zu erkennen<sup>[246]</sup>

Die Morphologie der Kristalle ist artspezifisch. Es sind nur grob kubische, lang gezogene prismatische und pfeilspitzenartige Geometrien der Magnetitpartikel zu finden. Ebenso besitzen die Kristalle eine hohe chemische Reinheit, zeigen nur geringe Größenvariationen und ordnen sich artspezifisch in der Zelle an, so dass man von einer biologisch-kontrollierten Kristallisation ausgehen muss<sup>[247, 248]</sup>. Kristallisationsexperimente mit extrahierten Membranproteinen bestätigten dies<sup>[249]</sup>. In TEM-Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass sich zuerst die Membranvesikel bilden und diese nachträglich mit  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  aufgefüllt werden<sup>[17]</sup>. Einige Arten kristallisieren Greigit ( $\text{Fe}_3\text{S}_4$ ) anstelle von Magnetit in den Magnetosomen aus, die in diesem Fall zusätzlich Vorstufen in Form von tetragonalem und kubischen Eisensulfid ( $\text{FeS}$ ) zeigen<sup>[250-252]</sup>.

Entscheidend für die Orientierung ist die geringe Größe der Partikel, die genau im Bereich einer einzelnen magnetischen Domäne liegt. Kleinere Kristalle wären nicht ferromagnetisch, größere würden sich in antiparallel ausgerichtete magnetische Domänen aufspalten und das magnetische Moment wieder aufheben. Notwendig ist neben der geringen Größe auch die Anordnung der Kristalle in Ketten, um ein möglichst großes effektives magnetisches Moment zu erzielen.



### 3.4.1 Charakterisierung der Magnetosomen von *Magnetospirillum gryphiswaldense*

Das hier untersuchte Bakterium wurde erstmals 1991 nahe Greifswald in einem eutrophen Fluss gefunden und beschrieben. Es gehört zur Familie der Rhodospirillaceae und enthält bis zu sechzig kub-oktaedrische, membrangebundene Magnetitkristalle, die einen durchschnittlichen Durchmesser von 45 nm aufweisen<sup>[253, 254]</sup>.

Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung der Magnetosomenmembran des Bakteriums *Magnetospirillum gryphiswaldense* und die Bestimmung der prozentualen Verteilung von Proteinen und Lipiden in der Membran. Die Proteinzusammensetzung wurde bereits untersucht<sup>[246]</sup> und sollte nun in Zusammenhang mit der vermuteten Phospholipiddoppelschicht gebracht werden.

#### 3.4.1.1 Experimentelle Vorgehensweise

Die Reinigung und Konzentration der Magnetosomen wurde von den Kooperationspartnern C. Lang und D. Schüler durchgeführt. Dazu wurde die Kultur von *Magnetospirillum gryphiswaldense* unter Druckeinwirkung (*French Press*)<sup>[255]</sup> aufgeschlossen, magnetisch separiert und durch Dichtegradientenzentrifugation in ein Saccharosepellet von den restlichen Zellbestandteilen getrennt. Aus diesem wurden sie dann mit Wasser ausgewaschen und durch mehrmaliges Waschen gereinigt.

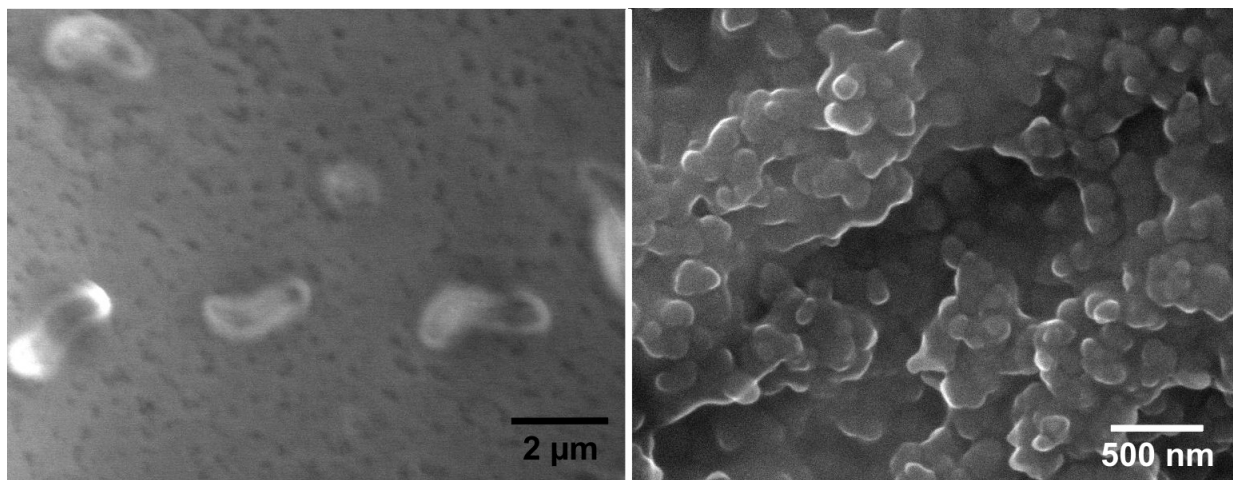
Die so gewonnene Magnetosomensuspension wurde im ESEM zusammen mit der Bakteriensuspension durch langsames Verdampfen des Wassers untersucht. Nähere Auskunft über das Masseverhältnis zwischen Magnetitpartikeln und umgebender Membran sollte die Thermogravimetrie mit IR-Kopplung geben.

Weitere Informationen über die die Magnetosomen umgebende organische Substanz wurden mittels <sup>1</sup>H- und <sup>13</sup>C- und <sup>31</sup>P-NMR-Untersuchungen (20 µL in 700 µL D<sub>2</sub>O) gewonnen. Die in D<sub>2</sub>O überführte Magnetosomensuspension wurde mit 6 µL 37 %iger HCl auf einen pH-Wert von 1 gebracht, um den ferrimagnetischen Magnetit aufzulösen.

Um Präparationsartefakte auszuschließen, wurden <sup>13</sup>C- und <sup>1</sup>H-NMR-Spektren von in D<sub>2</sub>O gelöster Saccharose aufgenommen. Die Lösung wurde mit der Zugabe von 6 µL 37 %iger HCl auf einen pH-Wert von 1 eingestellt.

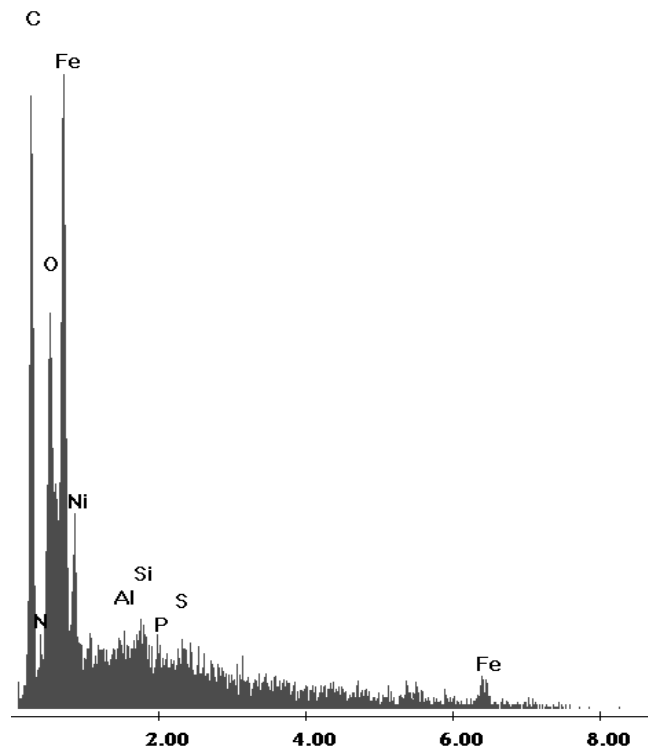
### 3.4.1.2 Ergebnisse und Diskussion

Aus den ESEM-Aufnahmen (Abb. 3.4.2) wird deutlich, dass die aus den etwa 2  $\mu\text{m}$  großen Bakterien (Abb. 3.4.2 links) extrahierten Magnetosomen (Abb. 3.4.2 rechts) Durchmesser zwischen 70 und 150 nm aufweisen. Aus TEM-Aufnahmen ist allerdings ein durchschnittlicher Partikeldurchmesser von 45 nm bekannt<sup>[246]</sup>. Da der wässrigen Magnetosomenlösung im ESEM durch Druckerniedrigung das Wasser entzogen wurde, kam es zu einer starken Agglomeration der Teilchen. Es ist zu vermuten, dass die hier abgebildeten Partikel bereits als Agglomerate vorliegen.



**Abb. 3.4.2:** Die Abbildung zeigt ESEM-Aufnahmen von lebenden magnetotaktischen Bakterien (links) und extrahierten Magnetosomen (rechts). Während die Zellen im feuchten Zustand bei einer Beschleunigungsspannung von 8 keV, einem Umgebungsdruck von 1,84 hPa und einer Temperatur von 2 °C gezeigt sind, ist die Aufnahme der Magnetosomen bei einer Beschleunigungsspannung von 12,5 keV im Hochvakuum vorgenommen worden.

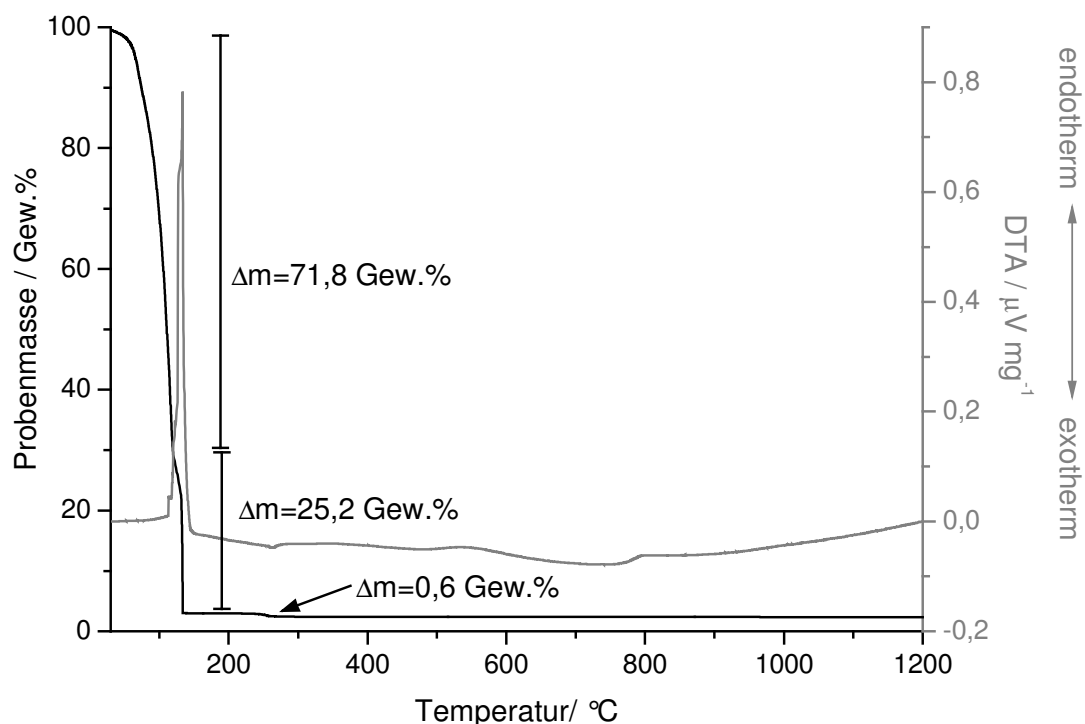
EDX-Aufnahmen (Abb. 3.4.3) dieser Kristalle zeigen hohe Anteile an Eisen, Sauerstoff und Kohlenstoff, die bestätigen, dass die abgebildeten Partikel Magnetosomen sein müssen.



**Abb. 3.4.3:** EDX-Aufnahme von extrahierten Magnetosomen; deutlich sind die hohen Anteile an Kohlenstoff, Sauerstoff und Eisen aus den Kristallen und der umgebenden organischen Membran zu erkennen. Die anderen detektierten Elemente rühren vom Probenträger her.

Während der thermogravimetrischen Untersuchung in Sauerstoffatmosphäre (Abb. 3.4.4) verdampft bis zu einer Temperatur von 122 °C das Suspensionswasser. Anschließend entweicht durch die Verbrennung der umgebenden, organischen Membran  $\text{CO}_2$  bis zu einer Temperatur von 292 °C. In diesem Temperaturbereich ist eine Stufe bei ca. 250 °C zu erkennen, die auf eine unterschiedliche Zusammensetzung der analysierten organischen Substanz hindeutet.

In Tabelle 3.4.1 sind die Massenverluste der einzelnen TGA-Stufen aufgeführt. Bis zu einer Temperatur von 1200 °C nimmt die verbleibende Probenmasse weiterhin etwa um 0,1 Gew.% ab. Möglich ist, dass sich im Verlauf der Reaktionen  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  gebildet hat, welches nun wieder zu  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  reduziert wird.



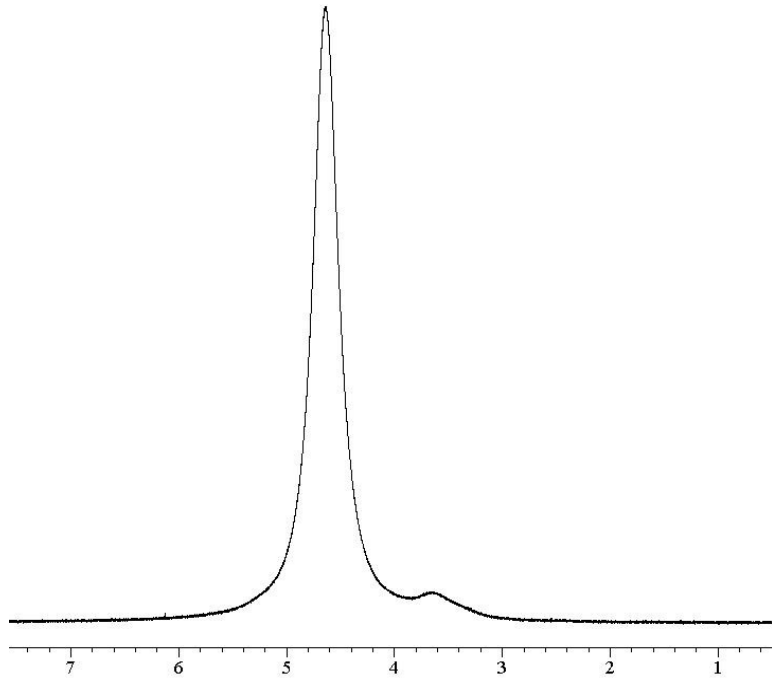
**Abb. 3.4.4:** Thermogravimetrische Untersuchung der Magnetosomensuspension unter Sauerstoff mit einer Heizrate von  $2 \text{ K min}^{-1}$ . Es wurden  $400 \mu\text{L}$  wässrige Suspension einer Gesamtmasse von  $282,0 \text{ mg}$  analysiert. Der Massenverlust von  $0,6 \text{ Gew.}\%$  ist mit einem Pfeil gekennzeichnet.

**Tab. 3.4.1:** Ergebnisse der TGA-Messungen der Magnetosomensuspension ( $m_0 = 282,0 \text{ mg}$ )

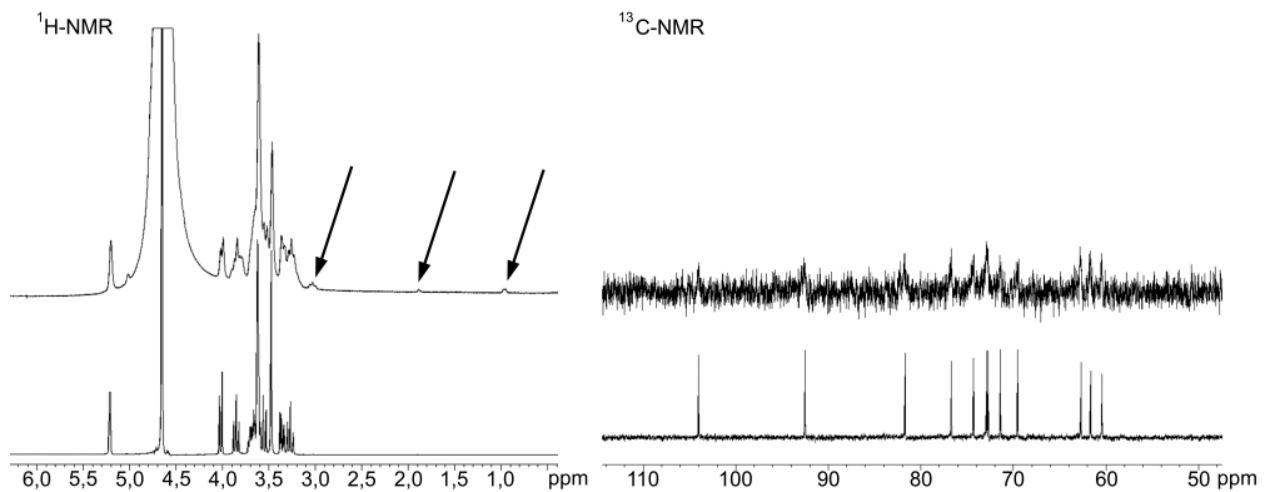
Material	Temperaturbereich / °C	Massenverlust / Gew. %	Massenverlust / mg
$\text{H}_2\text{O}$	30-122	71,8	202,5
organische Matrix	122-134	25,2	71,1
	134-292	0,6	1,7
$\text{Fe}_2\text{O}_3$	292-1200	0,1	0,3
verbleibendes $\text{Fe}_3\text{O}_4$	1200	2,3	6,5

NMR-Untersuchungen sollten genaueren Aufschluss darüber geben, welche organischen Bestandteile die umgebende Membran enthält. In einer ersten Messung zeigten sich stark verbreiterte Banden, die von den ferrimagnetischen Magnetitpartikeln hervorgerufen wurden (Abb. 3.4.5).

Mit Hilfe von Salzsäure sollte durch Auflösung des  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  die Verbreiterung der Peaks behoben werden. Allerdings reichte dieses Vorgehen nicht aus, um eine Peakverbreiterung zu verhindern, sondern führte nur zu geringfügig schmalere Peaks (Abb. 3.4.6).



**Abb. 3.4.5:** <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum der Magnetosomensuspension. Sowohl das in der Suspension enthaltene Restwasser als auch die durch das ferrimagnetische Magnetit verbreiterten Banden erschweren die Auswertung.



**Abb. 3.4.6:** <sup>1</sup>H- und <sup>13</sup>C-NMR-Spektren der Magnetosomensuspension. Unter dem jeweiligen Spektrum liegt das Vergleichsspektrum von Saccharose. Die zusätzlich gefundenen Peaks sind mit Pfeilen markiert. Die Lösungen lagen in D<sub>2</sub>O vor und wurden mit 37 %iger HCl auf einen pH-Wert von 1 gebracht.

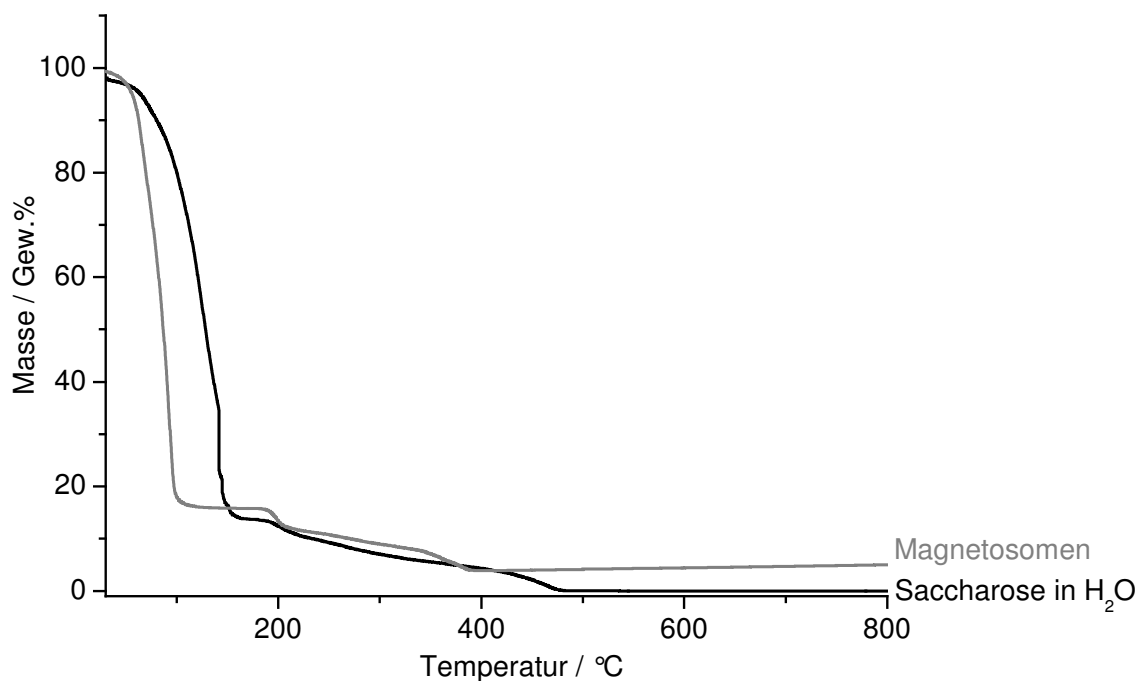
Es ist anzunehmen, dass das ferrimagnetische Magnetit aufgelöst wurde und sich paramagnetische Fe<sup>3+</sup>-Ionen gebildet hatten. Diese führen ebenfalls zu einer Peakverbreiterung, die allerdings weniger stark war als die Anwesenheit ferrimagnetischer

Substanzen. Ebenso möglich ist, dass noch völlig intakte Magnetosomenmembranen das Magnetit vor der Säure schützten und somit die Zersetzung verhinderten. Demzufolge lägen neben den für die Messung weniger kritischen  $\text{Fe}^{3+}$ -Ionen zudem weiterhin geringe Mengen Magnetit vor, die bedingt durch ihr ferrimagnetisches Moment die Messungen behinderten.

Nur zwei kleine Peaks zwischen 0 und 2 ppm im  $^1\text{H}$ -NMR deuten auf Substanzen hin, die deutlich weniger als 1 % der Probe ausmachen. Zudem erscheint ein Triplett bei 3,0 ppm, das nicht zum Saccharosespektrum gehört.

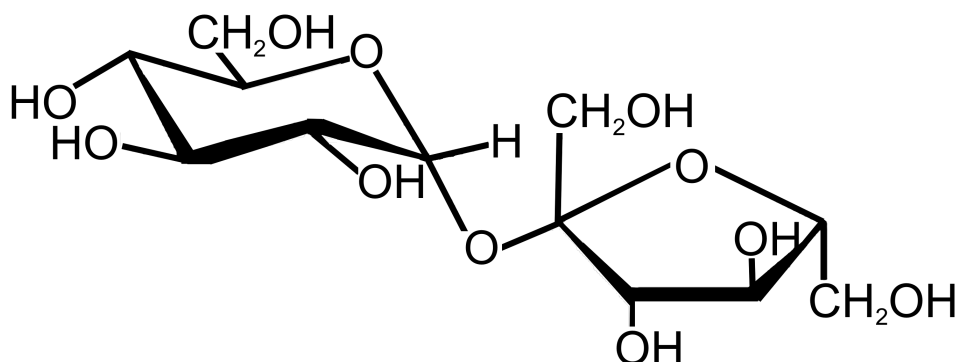
Das  $^{31}\text{P}$ -NMR zeigte auch nach mehrstündiger Messung keine Signale, weshalb zu vermuten ist, dass nur ein sehr geringer Anteil Phosphor in den Proben vorhanden ist.

Bedingt durch den Nachweis von Saccharose im NMR-Spektrum war es notwendig, vergleichende TGA-Messungen an einer Saccharoselösung durchzuführen. Dazu wurde eine 20 Gew.%ige Saccharoselösung in Wasser hergestellt und unter gleichen Bedingungen in der TGA analysiert. In Abbildung 3.4.7 sind die TGA-Messungen der Saccharoselösung und der Magnetosomensuspension einander gegenübergestellt worden.



**Abb. 3.4.7:** Thermogravimetrische Untersuchung der Magnetosomensuspension (grau) und der 20 Gew.%igen Saccharoselösung unter Sauerstoff mit einer Heizrate von  $2 \text{ K min}^{-1}$ . Es wurden ca. 400  $\mu\text{L}$  wässrige Suspension einer Gesamtmasse von 282,0 mg (Magnetosomen) bzw. 428,4 mg (Saccharose) analysiert.

Die Gegenüberstellung zeigte, dass der Anteil organischer Substanz in beiden Messungen der Saccharose (Abb. 3.4.8) zuzuordnen ist.



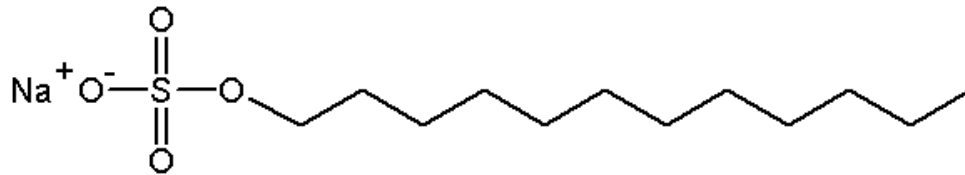
**Abb. 3.4.8:** Strukturformel der in den Proben als Präparationsartefakt identifizierten Saccharose.

Der unbestimmte Anteil der die Magnetosomen umgebenden organischen Matrix wird vermutlich von der aus der Reinigungsmethode der Magnetosomen stammenden Saccharose überlagert und ist demnach nicht bestimmbar.

Trotz aller Bemühungen konnte die organische Matrix der Magnetosomen weder in den TGA- noch in den NMR-Messungen genauer charakterisiert werden. Um eine Analyse sinnvoll durchführen zu können, muss daher ein neues Reinigungsverfahren der Magnetosomen erprobt werden, welches artefaktfrei arbeitet.

Da die Zugabe von HCl nur zu einer geringfügig kleineren Halbwertbreite der Peaks führte, das ferrimagnetische Moment aber nicht komplett verschwand, scheint nicht alles Magnetit aufgelöst worden zu sein. Ebenso möglich ist das Vorhandensein von paramagnetischen  $\text{Fe}^{3+}$ -Ionen. Versuche mit höheren HCl-Konzentrationen zeigten leider nur geringfügig schmalere Peaks, so dass eine Trennung von Magnetit und organischer Substanz ratsam wäre.

Die von Grünberg et al.<sup>[246]</sup> beschriebene Trennung von Magnetitpartikeln und Magnetosomenmembranen durch kurzes Aufkochen (5 min bei 95 °C) der Magnetosomen in einer 1 %igen SDS (Natriumdodecylsulfat)-Lösung zeigte im ersten Durchlauf keinen Erfolg. Es konnten nach der Prozedur keine Peaks mehr gefunden werden, die der Probe zuzuordnen waren. Zudem überlagern Signale des SDS (Abb. 3.4.9) einen Teil der gesuchten Peaks.



**Abb. 3.4.9:** Strukturformel von Natriumdodecylsulfat (SDS).

Sollte eine andere Reinigungsmethode für die Magnetosomen gefunden werden, könnte dieses Problem mit deuteriertem SDS gelöst werden.



## 4. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedenste Wege beschritten, um die Prinzipien der Biomineralisation näher zu beleuchten. Strukturelle Untersuchungen an Biomineralien sollten die Zusammensetzung, die (pseudo)polymorphe Phase und im Fall der Quallenstatolithen auch den Aufbau charakterisieren. Das Mineral von verschiedenen Teilen der Cuticula zweier Arten höherer Krebse (Malacostraca) konnte als magnesiumhaltiges Calciumcarbonat in der Modifikation des Calcit identifiziert werden, das geringe Mengen an amorphem Calciumphosphat enthielt. Die Unterschiede innerhalb der einzelnen untersuchten Schalentteile hinsichtlich ihres Mineralgehalts und ihres Gehalts an organischem Material konnten gut mit den Funktionen des Exoskeletts in Verbindung gebracht werden. Trotz systematischer Analyse des Materials mit verschiedensten Methoden bleiben Fragen hinsichtlich fehlender Ionen im Taschenkrebs offen. Die vorliegenden Ergebnisse fügen sich in die bisherige Charakterisierung von Crustaceen-Exoskeletten ein. Da es sich bei den untersuchten Arten um Meeresbewohner handelt und diese aufgrund ihres Lebensraums ausreichend  $\text{CaCO}_3$  aus der Umwelt aufnehmen können, wäre der Nachweis von ACC ein weiterer Hinweis für dessen Funktion als Precursorphase bei der Bildung von Biomineralien in extrazellulären Matrices.

Die kristallographischen Untersuchungen der Scyphozoenstatolithen bestätigen Bassanit als Biomineral in Schweresinnesorganen in der Superklasse der Rhopaliophora. Diese Daten liefern weitere Belege für die Richtigkeit des neu strukturierten Stammbaums der Cnidaria. Die in der älteren Literatur beschriebenen Funde von Gips können mit den Untersuchungen der letzten Jahre und den Ergebnissen dieser Arbeit in allen Fällen widerlegt und auf Präparationsfehler zurückgeführt werden. Die strukturellen Analysen der Statolithen konnten die Existenz von Kavitäten in einigen Kristallen bestätigen. Ungeklärt bleibt bisher allerdings ihre Funktion. Die im ESEM und mittels FIB nachgewiesenen porösen Strukturen im Zentrum der Kristalle müssen näher untersucht werden. Ob es sich bei den beschriebenen Strukturen um verschiedene Wachstumsphasen im Reifungsprozess der Kristalle handelt, muss durch Methoden, wie der nano-Computertomographie, deren Umsetzung für das Jahr 2008 im DESY geplant ist, in verschiedenen Wachstumsphasen nachgeprüft werden. Systematische Untersuchungen ermöglichen die Herstellung von Dünnschnitten der Rhopalien. Bisher konnte das Problem herausbrechender Kristalle noch nicht abschließend gelöst werden. Dennoch zeigten die Untersuchungen, dass die Herstellung von Schnitten und die

lung von Schnitten und die anschließende Untersuchung ohne Umkristallisation des Materials möglich sind. Zudem gaben die charakterisierten Schnitte Hinweise, dass das Mineral aus kleineren Kristalliten aufgebaut ist. Die Ergebnisse geben Grund zur Annahme, dass kleine Kompartimente vom Organismus mit mineralischer Substanz gefüllt werden, die sich an den bestehenden Kristall anlagern und diesen so vergrößern. Die untersuchten Biomineralien werden den bisherigen Untersuchungen zufolge im Gegensatz zu den Cuticulae der Crustaceen intrazellulär in vakuolenähnlichen Zellkompartimenten gebildet <sup>[206]</sup>. Die nähere Untersuchung des Mineralisationsprozesses innerhalb der Rhopalien könnte zum Verständnis des Mineralisationsprozesses innerhalb von Kompartimenten beitragen.

Die Charakterisierung der Magnetosomen magnetotaktischer Bakterien beschäftigt sich mit einer vergleichbaren Mineralisation in intrazellulären Kompartimenten. Im Gegensatz zu den Rhopalien handelt es sich hier um deutlich kleinere Kristalle, die in hoher Anzahl in einer Zelle liegen. Die sie umgebende Membran wurde in der Literatur nur auf ihre Proteinzusammensetzung hin untersucht. Trotz aller Bemühungen konnte nur der Hinweis auf weitere unbestimmte Substanzen erbracht werden, die bedingt durch die Aufschlussmethode der Bakterien mit Saccharose verunreinigt vorlagen.

Die in dieser Arbeit untersuchten Biomineralien können verschiedenen Prinzipien der Biomineralisation zugeordnet werden. Während die Magnetosomen der Bakterien eine additivdirigierte Mineralisation in Kompartimenten innerhalb der Zelle aufweisen, scheinen sich die intrazellulären Statolithen bereits aus mehreren Kristalliten zusammengefügt zu haben, die eine hierarchische Überstruktur in Form eines Mesokristalls ausbilden. Die Schale der Crustaceen ist aus einer extrazellulären Matrix aufgebaut, in die, möglicherweise über eine amorphe Vorstufe, eine Mineralphase hineinkristallisiert wird.

Um die vorliegenden Ergebnisse besser zu verstehen, wurden im Verlauf der Arbeit verschiedene Kristallisationsmethoden vergewendet. Die in den Bakterien beobachtete und für die Quallenstatolithen vermutete Kristallisation in Kompartimenten wurde mit der Kristallisation von Calciumsulfat in Mikroemulsionen imitiert. Die Ergebnisse zeigten, dass die Kristallisation der wasserarmen Phase des Calciumsulfats (Bassanit) möglich war. Dabei wurden mineralgefüllte Mizellen gefunden, die ungeordnet agglomeriert vorlagen. Zudem fanden sich große Einkristalle, die bei näherer Betrachtung am Kristallrand aus teilweise gefüllten Mizellen aufgebaut waren. Diese

Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass sich mit der geordneten Zusammenlagerung der Mizellen Mesokristalle ausbildeten.

Die systematische Analyse der von A. Becker konzipierten Multi-CCDD-Anlage brachte die Erkenntnis, dass die Mineralisation hier nur mit einer geeigneten Membran möglich ist. Diese sollte in wässriger Umgebung im Gegensatz zu Cellulosemembranen ungeladen vorliegen und einen Porendurchmesser von maximal vier Nanometern aufweisen. Ebenso ist die Anwendung von Gelen oder anderen mikroporösen Matrices denkbar, die mit den zu untersuchenden Additiven beladen werden. Bei den käuflich zu erwerbenden Gelen ist zu beachten, dass diese sich aus Polymeren (u. a. auch Alginaten) zusammensetzen, die einen entscheidenden Einfluss auf die Kristallisation ausüben können.

Der Einfluss verschiedener synthetischer Additive, die der organischen Matrix der aragonitischen Schneckenschale von *Biomphalaria glabrata* nachahmen sollten, wurde unter konstanten Versuchsbedingungen in der CCDD-Anlage untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass auch hier der Einfluss der Additive auf die Kristallisation ohne geeignete Kristallisationsmembran nicht reproduzierbar war. Die Art der verwendeten Dialysemembran überlagerte zum Teil den Einfluss der Additive. Da in der neueren Literatur beschriebene Ergebnisse mit demineralisierten Molluskenschalen zeigen, dass die Anlage die kontrollierte Mineralisation sehr gut ermöglicht, ist die Herstellung einer geeigneten, nachträglich mit Additiven funktionalisierbaren Matrix notwendig. Die vorliegende Anlage bietet die Möglichkeit mit einer geeigneten Kristallisationsmatrix die extrazelluläre Biomineralisation nah am biologischen System nachzuahmen.

Die ebenfalls in der CCDD-Anlage durchgeführten Untersuchungen mit Geweben von Rinderherzbeuteln, Schweineherzklappen und Schweineaorten als Mineralisationstemplate für Calciumphosphate zeigte deutlich bessere und reproduzierbare Resultate. Ziel war die vergleichende Untersuchung der Gewebe auf ihre Anfälligkeit zur Mineralisation hinsichtlich ihres Einsatzes als Herzklappenimplantate. Es wurde eine methodenabhängige, auf die Phosphatseite ausgerichtete Mineralisation beobachtet, dennoch konnten eindeutige Unterschiede im Mineralisationsgrad ausgemacht werden. Die bereits in der Literatur beschriebene stärkere Mineralisation des Schweinegewebes konnte in der vorliegenden Anlage bestätigt werden. Experimente an durchgeschnittenen Collagenfasern bestätigten die Vermutung nicht, dass diese den Kristallisationsstartpunkt bilden. Die gefundenen HAP-Kristalle umwuchsen

auf der Seite der Phosphatlösung die Collagenfasern, während sich auf der Oberfläche der Calciumseite eine dünne Schicht aus undefinierten Kristallisationsprodukten ausbildete.

Der Einfluss der Biofilmbestandteile auf die Präzipitation von Calciumcarbonat wurde mit der Ammoniumcarbonatmethode untersucht, um anschließend unter vergleichbaren Bedingungen Biofilme hinsichtlich ihrer Mineralisationsfähigkeit zu testen. Während das Bakterienalginat die Kristallisation in Richtung von Calcit dirigierte, zeigte das Additivgemisch der EPS wie erwartet alle drei Polymorphe des Calciumcarbonats. Das zum Vergleich eingesetzte Algenalginat ermöglichte die Kristallisation von kugelförmigen Gebilden, die aus Calcit-Rhomboedern zusammengesetzt waren. Folglich werden Biofilme mit hohen Alginatanteilen überwiegend Calcit ausbilden.

Um den Einfluss des gesamten Biofilms auf die Präzipitation zu untersuchen, wurden calciumhaltige PIA-Platten mit einem mucoiden Stamm von *Pseudomonas aeruginosa* unter CO<sub>2</sub>-Atmosphäre angezüchtet. Nach eintägiger Versuchsdauer zeigten sich CaCO<sub>3</sub>-Präzipitate, die sich flach auf den Biofilmen ausbreiteten. Unter den verwendeten Versuchsbedingungen ist die Ausbildung von Calciumcarbonaten auf diesen Biofilmen prinzipiell möglich. Ob derlei Bedingungen in der freien Natur auftreten und diese Bakterien auch für die Ausbildung von Sedimentgesteinen verantwortlich sind, ist allerdings mit den vorliegenden Experimenten nicht zu beantworten. Diese Versuche beschäftigen sich im Gegensatz zu den anderen hier aufgeführten Arbeiten zur Untersuchung der biologisch kontrollierten Biomineralisation mit der biologisch induzierten, epizellulären Biomineralisation.

In der vorliegenden Arbeit konnten verschiedene Biomineralien und biologische Kompositmaterialien charakterisiert werden, die die in der Literatur beschriebenen Zusammensetzungen bestätigten. Zudem konnte mit der Kristallisation in Mikroemulsionen Bassanit hergestellt und die Existenz von Mesokristallen untermauert werden. Die systematische Untersuchung der Kristallisation in der CCDD- und Multi-CCDD-Anlage konnte zeigen, dass mit einer geeigneten, noch zu suchenden Matrix der Einfluss von Additiven auf die Kristallisation unter geregelten, konstanten Bedingungen möglich und sinnvoll ist.

## 5. Literatur

- [1] M. Eppe, *Biomaterialien und Biomineralisation*, B. G. Teubner Verlag, Wiesbaden, **2003**.
- [2] A. Becker, A. Ziegler, M. Eppe, *Dalton Trans.* **2005**, 1814.
- [3] B. Hasse, H. Ehrenberg, J. C. Marxen, W. Becker, M. Eppe, *Chem. Eur. J.* **2000**, 6, 3679.
- [4] F. Peters, K. Schwarz, M. Eppe, *Thermochim. Acta* **2000**, 361, 131.
- [5] K. Kawasaki, T. Suzuki, K. M. Weiss, *PNAS* **2004**, 101, 11356.
- [6] D. Raabe, C. Sachs, P. Romano, *Acta Mater.* **2005**, 53, 4281.
- [7] W. Wiltshko, R. Wiltshko, *J. Comp. Physiol. A* **2005**, 191, 675.
- [8] G. Fränkel, *J. Comp. Physiol. A* **1925**, 2, 658.
- [9] J. Aizenberg, A. Tkachenko, S. Weiner, L. Addadi, G. Hendler, *Nature* **2001**, 412, 819.
- [10] S. Mann, *J. Mater. Chem.* **1995**, 5, 935.
- [11] J. Aizenberg, *Adv. Mater.* **2004**, 16, 1295.
- [12] H. A. Lowenstam, *Science* **1981**, 211, 1126.
- [13] A. Becker, Dissertation thesis, Universität Duisburg-Essen **2005**.
- [14] H. A. Lowenstam, S. Weiner, *On biomineralization*, Oxford University Press, New York, **1989**.
- [15] S. Mann, *Biomineralization - Principles and concepts in bioinorganic materials chemistry*, Oxford University Press, Oxford, **2001**.
- [16] S. V. Dorozhkin, M. Eppe, *Angew. Chem.* **2002**, 114, 3260.
- [17] E. Bäuerlein, in *Biomineralization* (Ed.: E. Bäuerlein), Wiley-VCH, Weinheim, Germany, **2000**, pp. 61.
- [18] L. Addadi, S. Weiner, *Angew. Chem.* **1992**, 104, 159.
- [19] H. Cölfen, M. Antonietti, *Angew. Chem.* **2005**, 117, 5714.
- [20] L. Addadi, D. Joester, F. Nudelman, S. Weiner, *Chem. Eur. J.* **2006**, 12, 980.
- [21] S. Weiner, W. Traub, *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* **1984**, 304, 425.
- [22] J. C. Marxen, W. Becker, D. Finke, B. Hasse, M. Eppe, *J. Moll. Stud.* **2003**, 69, 113.
- [23] N. Nassif, N. Pinna, N. Gehrke, M. Antonietti, C. Jäger, H. Cölfen, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2005**, 102, 12653.
- [24] N. Watabe, V. R. Meenakshi, P. L. Blackwelder, E. M. Kurtz, D. G. Dunkelberger, in *Mechanisms of biomineralization in the invertebrates and plants* (Eds.: N. Watabe, Wilbur, K M., K. M. Wilbur), University South Carolina Press, Columbia, **1976**, pp. 283.
- [25] C. Sanchez, H. Arribart, M. M. Giraud Guille, *Nature Materials* **2005**, 4, 277.
- [26] W. Kleber, H.-J. Bautsch, J. Bohm, *Einführung in die Kristallographie*, 18. ed., Verlag Technik Berlin, München, **1998**.
- [27] A. P. Wheeler, J. W. George, C. A. Evans, *Science* **1981**, 212, 1397.
- [28] W. L. de Keyser, L. Degueldre, *Bull. Soc. Chim. Belg.* **1950**, 59, 40.
- [29] K. Naka, Y. Chujo, *Chem. Mater.* **2001**, 13, 3245.
- [30] Y. Kitano, D. W. Hood, *Geochim. Cosmochim. Acta* **1965**, 29, 29.
- [31] S. Mann, J. M. Didymus, N. P. Sanderson, B. R. Heywood, E. J. A. Samper, *J. Chem. Soc., Faraday Trans.* **1990**, 86, 1873.
- [32] S. Mann, *Nature* **1993**, 365, 499.
- [33] L. Addadi, S. Weiner, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1985**, 82, 4110.
- [34] A. Becker, W. Becker, J. C. Marxen, M. Eppe, *Z. allg. anorg. Chem.* **2003**, 629, 2305.
- [35] C. A. Neira, M. S. Fernández, J. Retuert, J. L. Arias, in *Mat. Res. Soc. Symp.*

- Proc.*, Vol. EXS-1, Materials Research Society, **2004**, pp. H6.18.1.
- [36] M. B. Tomson, G. H. Nancollas, *Science* **1978**, *200*, 10591060.
- [37] M. Iijima, H. Kamemizu, N. Wakamatsu, T. Goto, Y. Doi, Y. Moriwaki, *J. Cryst. Growth* **1998**, *193*, 182.
- [38] G. H. Nancollas, S. J. Zawacki, in *Industrial Crystallisation*, Vol. 84, Elsevier, Amsterdam, **1984**, pp. 51.
- [39] H. Gilman, D. W. L. Hukins, *J. Inorg. Biochem.* **1994**, *55*, 21.
- [40] A. Tsortos, G. H. Nancollas, *J. Colloid Interface Sci.* **2002**, *250*, 159.
- [41] R. J. Park, F. C. Meldrum, *Adv. Mater.* **2002**, *14*, 1167.
- [42] S. Busch, U. Schwarz, R. Kniep, *Adv. Funct. Mater.* **2003**, *13*, 189.
- [43] H. Ehrlich, T. Douglas, D. Scharnweber, T. Hanke, R. Born, S. Bierbaum, H. Worch, *Z. Anorg. Allgm. Chem.* **2005**, *631*, 1825.
- [44] E. Loste, R. J. Park, J. Warren, F. C. Meldrum, *Adv. Funct. Mater.* **2004**, *14*, 1211.
- [45] I. Manjubala, S. Scheler, J. Bössert, K. D. Jandt, *Acta Biomater.* **2006**, *2*, 75.
- [46] M. Iijima, J. Moradian-Oldak, *J. Mater. Chem.* **2004**, *14*, 2189.
- [47] F. Peters, M. Epple, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* **2001**, 3585.
- [48] F. Heinemann, L. Treccani, M. Fritz, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2006**, *344*, 45.
- [49] S. Mann, J. P. Hannington, R. J. P. Williams, *Nature* **1986**, *324*, 565.
- [50] C. Viravaidya, M. Li, S. Mann, *Chem. Commun.* **2004**, 2181.
- [51] M. Li, B. Lebeau, S. Mann, *Adv. Mater.* **2003**, *15*, 2032.
- [52] S. Sadasivan, D. Khushalani, S. Mann, *Chem. Mater.* **2005**, *17*, 2765.
- [53] M. Hesse, H. Meier, B. Zeeh, *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*, 7. ed., Georg Thieme Verlag, Stuttgart, **2005**.
- [54] Römpp, CD-ROM ed., Georg Thieme Verlag, Stuttgart, **1995**.
- [55] W. Massa, *Kristallstrukturbestimmung*, 4. ed., B. G. Teubner Verlag, Wiesbaden, **2005**.
- [56] L. Spieß, R. Schwarzer, H. Behnken, G. Teichert, *Moderne Röntgenbeugung - Röntgendiffraktometrie für Materialwissenschaftler, Physiker und Chemiker*, 1 ed., B. G. Teubner Verlag, Wiesbaden, **2005**.
- [57] M. Knapp, V. Joco, C. Baetz, H. H. Brecht, A. Berghaeuser, H. Ehrenberg, H. von Seggern, H. Fuess, *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res., Sect A* **2004**, *521*, 565.
- [58] M. Knapp, C. Baetz, H. Ehrenberg, H. Fuess, *J. Synchrotron Rad.* **2004**, *11*, 328.
- [59] W. J. Kabsch, *Appl. Cryst.* **1993**, *26*, 795.
- [60] W. S. Sheldrick, 6.12 ed., Bruker ASX Inc., Madison, WI, USA, **2001**.
- [61] D. Krug, in *Untersuchungsmethoden in der Chemie - Einführung in die moderne Analytik* (Eds.: H. Naumer, W. Heller), Georg Thieme Verlag, Stuttgart, **1990**.
- [62] W. F. Hemminger, H. K. Cammenga, *Methoden der Thermischen Analyse*, Vol. XXIV, Springer Verlag, Berlin, **1989**.
- [63] P. J. Goodhew, F. J. Humphreys, *Elektronenmikroskopie: Grundlagen und Anwendungen*, MacGraw-Hill, London, **1991**.
- [64] A. R. Spurr, *J. Ultrastruct. Res.* **1969**, *26*, 31.
- [65] T. F. Anderson, *Trans. NY Acad. Sci. (Ser. II)* **1951**, *13*, 130.
- [66] E. N. Maslen, V. A. Streltsov, N. R. Streltsova, *Acta Crystallogr.* **1993**, *B 49*, 636.
- [67] D. Jarosch, G. Heger, *Mineralogy and Petrology* **1986**, *35*, 127.
- [68] B. Dickens, J. S. Bowen, *J. Res. Natl. Bur. Stand.* **1971**, *A 75*, 27.

- [69] S. R. Kamhi, *Acta Cryst.* **1963**, 16, 770.
- [70] H. Effenberger, *Monatsh. Chem.* **1981**, 112, 899.
- [71] K.-F. Hesse, H. Küppers, E. Suess, *Z. Kristallogr.* **1983**, 163, 227.
- [72] L. Brecevic, A. E. Nielsen, *J. Cryst. Growth* **1989**, 98, 504.
- [73] M. G. Taylor, K. Simkiss, G. N. Greaves, M. Okazaki, S. Mann, *Proc. R. Soc. Lond.* **1993**, 252B, 75.
- [74] J. Aizenberg, G. Lambert, L. Addadi, S. Weiner, *Adv. Mater.* **1996**, 8, 222.
- [75] E. Beniash, J. Aizenberg, L. Addadi, S. Weiner, *Proc. R. Soc. Lond.* **1997**, 264, 461.
- [76] A. Becker, U. Bismayer, M. Epple, H. Fabritius, B. Hasse, J. Shi, A. Ziegler, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **2003**, 551.
- [77] Y. Levi-Kalisman, S. Raz, S. Weiner, L. Addadi, I. Sagi, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **2000**, 3977.
- [78] Y. Levi-Kalisman, S. Raz, S. Weiner, L. Addadi, I. Sagi, *Adv. Funct. Mater.* **2002**, 12, 43.
- [79] L. Addadi, S. Raz, S. Weiner, *Adv. Mater.* **2003**, 15, 959.
- [80] I. S. Johnston, *Scan. Electron Micros.* **1979**, 11, 421.
- [81] H. Elderfield, C. J. Bertram, J. Erez, *Earth Planet. Sc. Lett.* **1996**, 142, 409.
- [82] S. Nees, L. Armand, P. DeDekker, M. Labracherie, V. Passlow, *Mar. Micro-paleontol.* **1999**, 38, 69.
- [83] A. Ziegler, B. Miller, *Zoomorphology* **1997**, 117, 181.
- [84] J. Aizenberg, J. Hanson, M. Ilan, L. Leiserowitz, T. F. Koetzle, L. Addadi, S. Weiner, *FASEB J.* **1995**, 9, 262.
- [85] Y. A. Vinnikov, M. Z. Aronove, T. A. Kharkeevich, T. P. Tsirulis, E. A. Lavrova, Y. V. Natochin, *Z. mikrosk.-anat. Forsch.* **1981**, 95, 127.
- [86] Y. A. Vinnikov, D. V. Lychakov, K. A. Koichev, A. Boiadzhieva-Mikhailova, I. Khristov, *Zh. Evol. Biokhim. Fiziol.* **1981**, 17, 474.
- [87] E. Riedel, in *Anorganische Chemie*, Walter de Gruyter, Berlin, **2004**, pp. 524.
- [88] W. Dreybrodt, *Processes in Karst systems - Physics, chemistry, and geology*, Vol. 4, Springer-Verlag, Berlin, **1988**.
- [89] F. Heinemann, Diploma thesis, Universität Bremen **2005**.
- [90] C. A. Orme, A. Noy, A. Wierzbicki, M. T. McBride, M. Grantham, H. H. Teng, P. M. Dove, J. J. DeYoreo, *Nature* **2001**, 411, 775.
- [91] F. C. Meldrum, S. T. Hyde, *J. Cryst. Growth* **2001**, 231, 544.
- [92] S. Raz, S. Weiner, L. Addadi, *Adv. Mater.* **2000**, 12, 38.
- [93] F. Manoli, E. Dalas, *J. Cryst. Growth* **2000**, 218, 359.
- [94] C. M. Li, G. D. Botsaris, D. L. Kaplan, *J. Cryst. Growth* **2002**, 2, 387.
- [95] V. V. Hardikar, E. Matijevic, *Colloids Surf A* **2001**, 186, 23.
- [96] F. H. Shen, Q. L. Feng, C. M. Wang, *J. Cryst. Growth* **2002**, 242, 239.
- [97] Q. L. Feng, G. Pu, Y. Pei, F. Z. Cui, H. D. Li, T. N. Kim, *J. Cryst. Growth* **2000**, 216, 459.
- [98] J. J. M. Donners, B. R. Heywood, E. W. Meijer, R. J. M. Nolte, C. Roman, A. Schenning, N. Sommerdijk, *Chem. Commun.* **2000**, 19, 1937.
- [99] M. Sedlak, H. Cölfen, *Macromol. Chem. Phys.* **2001**, 202, 587.
- [100] H. Cölfen, L. M. Qi, *Progr. Coll. Pol. Sci.* **2001**, 117, 200.
- [101] K. Naka, D. K. Keum, Y. Tanaka, Y. Chujo, *Chem. Commun.* **2000**, 16, 1537.
- [102] G. Falini, *Int. J. Inorg. Mater.* **2000**, 2, 455.
- [103] G. Falini, S. Fermani, M. Gazzano, A. Ripamonti, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **2000**, 3983.
- [104] O. Grassmann, G. Müller, P. Löbmann, *Chem. Mater.* **2002**, 14, 4530.
- [105] M. Li, S. Mann, *Adv. Funct. Mater.* **2002**, 12, 773.

- [106] H. Cölfen, *Current Opinion in Colloid and Interface Science* **2003**, 8, 23.
- [107] N. F. Hadley, *Sci. Am.* **1986**, 255, 98.
- [108] B. K. Filshie, in *Insect Ultrastructure, Vol. 1* (Eds.: King, Akai), Plenum Publ., New York, **1982**, pp. 281.
- [109] Y. Bouligand, *Tissue Cell.* **1972**, 4, 189.
- [110] F. G. Barth, *Cell Tissue Res.* **1970**, 104, 87.
- [111] M.-M. Giraud-Guille, *Tissue Cell.* **1984**, 16, 75.
- [112] S. Weiner, L. Addadi, *J. Mater. Chem.* **1997**, 7, 689.
- [113] D. Raabe, P. Romano, C. Sachs, A. Al-Sawalmih, H.-G. Brokmeier, S.-B. Yi, G. Servos, H. G. Hartwig, *J. Cryst. Growth* **2005**, 283, 1.
- [114] C. Sachs, H. Fabritius, D. Raabe, *J. Mat. Res.* **2006**, 21, 1987.
- [115] E. B. Karnefsky, J. Atema, R. H. Elgin, *Biol. Bull.* **1989**, 176, 247.
- [116] J. Crothers, M. Crothers, in *AIDGAP Guide, Vol. 5*, Field Studies Council and Richmond Publishing Company, Somerset, **1988**, pp. 753.
- [117] P. Romano, H. Fabritius, D. Raabe, *Acta Biomater* **2007**.
- [118] H. Fabritius, A. Ziegler, *J. Struct. Biol.* **2003**, 142, 281.
- [119] J. W. Costerton, K.-J. Cheng, G. G. Geesey, T. I. Ladd, J. C. Nickel, M. Dasgupta, T. J. Marrie, *Ann. Rev. Microbiol.* **1987**, 41, 435.
- [120] J. W. Schopf, J. M. Hayes, M. R. Walter, in *Earth's earliest biosphere* (Ed.: J. W. Schopf), Princeton Univ. Press, New Jersey, **1983**, pp. 361.
- [121] H.-C. Flemming, J. Wingender, *Biol. unserer Zeit* **2001**, 3, 169.
- [122] H.-C. Flemming, *Biofilme, Biofouling und mikrobielle Materialschädigung, Vol. 129*, Oldenbourg Verlag, München, **1994**.
- [123] D. de Beer, P. Stoodley, *Wat. Sci. Tech.* **1995**, 32, 11.
- [124] D. de Beer, P. Stoodley, F. Roe, Z. Lewandowski, *Biotechnol. Bioeng.* **1994**, 43, 1131.
- [125] P. L. Bishop, *Wat. Sci. Tech.* **1997**, 36, 287.
- [126] H.-C. Flemming, J. Wingender, R. Moritz, C. Mayer, in *Biofilms in aquatic systems* (Eds.: W. Keevil, A. F. Godfree, D. M. Holt, C. S. Dow), Royal Society of Chemistry, Cambridge, **1999**, pp. 1.
- [127] H.-C. Flemming, J. Wingender, C. Mayer, V. Körstgens, W. Borchard, in *Community structure and co-operation in biofilms, Vol. 59. SGM symposium* (Eds.: H. Lappin-Scott, P. Gilbert, M. Wilson, D. Allison), Cambridge University Press, Cambridge, **2000**, pp. 87.
- [128] H.-C. Flemming, J. Wingender, *Vom Wasser* **2000**, 94, 245.
- [129] V. Körstgens, H.-C. Flemming, J. Wingender, W. Borchard, *Wat. Sci. Tech.* **2001**, 43, 49.
- [130] P. Gacesa, N. J. Russell, in *Pseudomonas infection and alginates - Biochemistry, genetics and pathology* (Eds.: P. Gacesa, N. J. Russell), Chapman and Hall, London, **1990**, pp. 29.
- [131] E. C. C. Stanford, Patentschrift 142, London, **1881**.
- [132] E. C. C. Stanford, *Chem. News* **1883**, 47, 254.
- [133] I. W. Sutherland, *Biotechnology of exopolysaccharides*, Cambridge Univ. Press., Cambridge, **1990**.
- [134] I. W. Sutherland, *Biotech. Adv.* **1994**, 12, 393.
- [135] N. Emmerichs, J. Wingender, H.-C. Flemming, C. Mayer, *Int. J. Biol. Macromol.* **2004**, 34, 73.
- [136] J. R. W. Govan, in *Pseudomonas infection and alginates - Biochemistry, genetics and pathology* (Eds.: P. Gacesa, N. J. Russell), Chapman and Hall, London, **1990**, pp. 51.



- [137] L. Addadi, J. Moradian-Oldak, E. Shay, N. G. Maroudas, S. Weiner, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1987**, *84*, 2732.
- [138] J. Aizenberg, S. Albeck, S. Weiner, L. Addadi, *J. Cryst. Growth* **1994**, *142*, 156.
- [139] S. Albeck, L. Addadi, S. Weiner, *Conn. Tiss. Res.* **1996**, *35*, 365.
- [140] J. C. Marxen, W. Becker, *Comp. Biochem. Physiol.* **1997**, *118B*, 23.
- [141] J. C. Marxen, M. Hammer, T. Gehrke, W. Becker, *Biol. Bull.* **1998**, *194*, 231.
- [142] J. C. Marxen, W. Becker, *Comp. Biochem. Physiol.* **2000**, *127B*, 235.
- [143] J. C. Marxen, M. Nimtz, W. Becker, K. Mann, *Biochim Biophys Acta* **2003**, *1650*, 92.
- [144] J. C. Marxen, Dissertation thesis, Universität Hamburg **1995**.
- [145] A. Becker, Diploma thesis, Ruhr-Universität Bochum **2002**.
- [146] C. S. Sikes, A. P. Wheeler, in *Biom mineralization and biological metal accumulation* (Eds.: P. Westbroek, E. W. de Jong), Reidel Publishing Co., Dordrecht, **1983**, pp. 285.
- [147] A. Becker, M. Eppe, *Mater. Res. Symp. Proc.* **2005**, *873E*, K12.1.1.
- [148] J. C. Elliot, *Structure and chemistry of the apatites and other calcium orthophosphates*, Elsevier, Amsterdam, **1994**.
- [149] E. Fernandez, F. J. Gil, M. P. Ginebra, F. C. M. Driessens, J. A. Planell, S. M. Best, *J. Mater. Sci.: Mater. Med.* **1999**, *10*, 169.
- [150] E. Fernandez, F. J. Gil, M. P. Ginebra, F. C. M. Driessens, J. A. Planell, S. M. Best, *J. Mater. Sci.: Mater. Med.* **1999**, *10*, 177.
- [151] M. Eppe, P. Lanzer, *Z. Kardiologie* **2001**, *90*, III/2.
- [152] E. Wintermantel, S. W. Ha, *Medizintechnik mit biokompatiblen Werkstoffen und Verfahren*, 3 ed., Springer-Verlag GmbH, Heidelberg, **2002**.
- [153] C. Giachelli, *Z. Kardiologie* **2001**, *90*, III/31.
- [154] B. Glasmacher, E. Nellen, H. Reul, G. Rau, *Materialwiss. Werkst.* **1999**, *30*, 806.
- [155] M. Deiwick, B. Glasmacher, E. Pettenazzo, D. Hammel, W. Castellón, G. Thiene, H. Reul, E. Berendes, H. H. Scheld, *J. Thorac. Cardiovasc. Sur.* **2001**, *49*, 78.
- [156] E. Pettenazzo, M. Deiwick, G. Thiene, G. Molin, B. Glasmacher, F. Martignago, T. Bottio, H. Reul, M. Valente, *J. Thorac. Cardiovasc. Sur.* **2001**, *121*, 500.
- [157] M. Shen, P. Marie, D. Farge, S. Carpentier, C. D. Pollak, M. Hott, L. Chen, B. Martinet, A. Carpentier, *C. R. Acad. Sci. III* **1997**, *320*, 49.
- [158] M. N. Girardot, J. M. Girardot, M. Torrianni, in *New horizons and the future of heart valve prostheses* (Eds.: S. Gabbay, R. W. M. Frater), Silent Partners Inc., Austin, **1994**.
- [159] G. Gong, Z. Ling, E. Seiffter, S. M. Factor, R. W. M. Frater, *Eur. J. Cardio-Thorac.* **1991**, *5*, 288.
- [160] G. Golomb, J. J. Schoen, M. S. Smith, J. Linden, M. Dixon, R. J. Levy, *Am. J. Pathol.* **1987**, *127*, 122.
- [161] M. E. Nimni, D. Cheung, B. Strates, M. Kodana, K. Sheikh, *J. Biomed. Mat. Res.* **1987**, *21*, 741.
- [162] V. J. Ferrans, S. L. Hilbert, M. Jones, in *Replacement cardiac valves* (Eds.: E. Bodnar, R. W. M. Frater), Pergamon Press, New York, **1991**, pp. 49.
- [163] Y. S. Lee, *J. Electron. Microsc.* **1994**, *43*, 131.
- [164] B. Glasmacher, M. Deiwick, H. Reul, H. Knesch, D. Keus, G. Rau, *Int. J. Artif. Organs.* **1997**, *20*, 267.
- [165] M. S. Sachs, D. B. Smith, E. D. Hiester, *J. Biomed. Mater. Res.* **1998**, *41*, 131.
- [166] S. V. Dorozhkin, E. I. Dorozhkina, F. Peters, M. Eppe, *Eur. J. Trauma* **2002**, *2*,

- 115.
- [167] D. Mavrilas, J. Kaposos, P. G. Koutsoukos, D. Dougenis, *J. Mater. Sci.: Mater. Med.* **2004**, 15, 699.
  - [168] M. Thubrikar, *The aortic heart valve*, CRC Press, Boca Raton, Florida, **1983**.
  - [169] S. L. Hilbert, M. Jones, V. J. Ferrans, in *Encyclopedic handbook of biomaterials and bioengineering Part B: Applications* (Ed.: D. L. Wise), Dekker, M., New York, **1995**, pp. 1111.
  - [170] F. J. Schoen, *J. Heart Valve Dis.* **1997**, 6, 1.
  - [171] G. W. Hastings, *Cardiovascular biomaterials*, Springer-Verlag, London, **1992**.
  - [172] M. E. Nimni, D. T. Cheung, B. Strates, M. Kodama, K. Sheikh, in *Collagene Volume III: Biotechnology* (Ed.: M. E. Nimni), CRC Press, Boca Raton, Florida, **1988**.
  - [173] J. F. Bateman, S. R. Lamandé, A. M. Ramshaw, in *Extracellular matrix Volume 2: Molecular components and interactions* (Ed.: W. D. Comper), Harwood Academic Publishers, Amsterdam, **1996**, pp. 22.
  - [174] M. E. Nimni, R. D. Harkness, in *Collagen Volume I: Biochemistry* (Ed.: M. E. Nimni), CRC Press, Boca Raton, Florida, **1988**.
  - [175] I. V. Yannas, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1990**, 29, 20.
  - [176] T. Nemetschek, *Verh. Anat. Ges.* **1981**, 75, 47.
  - [177] D. J. S. Hulmes, T. J. Wess, D. J. Prockop, P. Fratzl, *Biophys. J.* **1995**, 68, 1661.
  - [178] J. Vaculik, *Leder Schuhe Lederwaren* **1983**, 3, 132.
  - [179] E. Heidemann, *Fundamentals of leather manufacturing*, 1 ed., Hanser Publishers, München, **1993**.
  - [180] S. T. Li, in *The biomedical engineering handbook* (Ed.: J. D. Bronzino), CRC Press in coop. with IEEE Press, Boca Raton, Florida, **1995**, pp. 627.
  - [181] D. Mavrilas, Y. Missirlis, *J. Biomech.* **1991**, 24, 331.
  - [182] H.-M. Kim, T. Miyazaki, T. Kokubo, T. Nakamura, *Key Eng. Mater.* **2001**, 192-195, 47.
  - [183] R. A. Young, P. E. Mackie, *Mater. Res. Bull.* **1980**, 15, 17.
  - [184] G. A. Block, P. Raggi, A. Bellasi, L. Kooienga, D. M. Spiegel, *Kidney Int.* **2007**.
  - [185] H. Ayala-Palma, R. Correa-Rotter, in *Genzyme's "Young Investigators University" Meeting*, Amsterdam, **2007**.
  - [186] M. Oetzel, Dissertation thesis, Rheinisch-Westfälische Technische Hochschule Aachen **1999**.
  - [187] D. Freyer, Dissertation thesis, Technische Universität Bergakademie Freiberg **2000**.
  - [188] R. Brauns, K. F. Chuboda, in *Spezielle Mineralogie, Vol. 31/ 31a*, Walter de Gruyter & Co, Berlin, **1964**, pp. 98.
  - [189] W. A. Deer, R. A. Howie, J. Zussman, in *An introduction to the rock forming minerals*, 12. ed., Longman Group, London, **1980**, pp. 466.
  - [190] G. Strübel, S. H. Zimmer, in *Lexikon der Mineralogie*, dtv, Stuttgart, **1982**.
  - [191] E. Gierth, R. Graubner, H. Harder, W. Kutterer, R. Mentzel, A. Rolf, in *Lexikon für Mineralien - und Gesteinsfreunde*, C. J. Bucher AG, Luzern/Frankfurt a. M., **1977**, pp. 68.
  - [192] W. Abriel, R. Nesper, *Z. Kristallogr.* **1993**, 205, 99.
  - [193] A. F. Holleman, E. Wiberg, N. Wiberg, in *Lehrbuch der anorganischen Chemie*, 101 ed., Walter de Gruyter, Berlin, **1995**, pp. 1136.
  - [194] B. F. Pedersen, D. Semmingsen, *Acta Crystallogr.* **1982**, B38, 1074.
  - [195] C. Bezou, A. Nonat, K. Mutin, *J. Solid State Chem.* **1995**, 117, 165.

- [196] G. A. Lager, T. Armbruster, F. J. Rotella, J. D. Jorgensen, D. G. Hinks, *Am. Min.* **1984**, 69, 910.
- [197] F. Hanic, *Br. Ceram. Trans. J.* **1985**, 84, 22.
- [198] C. Kochapan, M. Jung, *Quintessenz* **1992**, 43, 527.
- [199] J. F. Gerrath, *Progr. Phycol. Res.* **1993**, 9, 79.
- [200] O. Kopetzky-Rechtperg, *Beihefte zum Botanischen Centralblatt* **1930**, XLVI, 291.
- [201] A. J. Brook, A. Fortheringham, J. Bradly, A. Jenkins, *Br. phycol. J.* **1980**, 15, 261.
- [202] J. R. Wilcock, C. C. Perry, R. J. P. Williams, A. J. Brook, *Proc. R. Soc. Lond. Series B, Biological Science* **1989**, 238, 203.
- [203] D. Spangenberg, C. W. Beck, *Trans. Amer. Microsc. Soc.* **1968**, 87, 329.
- [204] D. B. Spangenberg, in *The mechanisms of mineralization in the invertebrates and plants* (Ed.: N. Watabe, Wilbur, K M.), University of South Carolina Press, Columbia, South Carolina, **1976**, pp. 231.
- [205] D. Pollmanns, M. Hündgen, *Zool. Jb. Anat.* **1981**, 105, 508.
- [206] H. Tiemann, I. Sötje, G. Jarms, C. Paulmann, M. Eppler, B. Hasse, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **2002**, 1266.
- [207] A. Becker, I. Sötje, C. Paulmann, F. Beckmann, T. Donath, R. Boese, O. Prymak, H. Tiemann, M. Eppler, *Dalton Trans.* **2005**, 1545.
- [208] H. Tiemann, I. Sötje, A. Becker, G. Jarms, M. Eppler, *Zool. Anz.* **2006**, 245, 13.
- [209] R. Wehner, W. Gehring, in *Zoologie*, 23 ed., Georg Thieme Verlag, Stuttgart, **1995**, p. 639.
- [210] P. Ax, *Das System der Metazoa I - Ein Lehrbuch der phylogenetischen Systematik*, Fischer Verlag, Stuttgart, **1995**.
- [211] C. von Linné, in *Systema Naturae per regna tria naturae, secundum classes, ordines, genera, species, cum characteribus, differentiis, synonymis, locis*, 12 ed., Salvius, Stockholm, **1766**, pp. 1.
- [212] J. J. Fearon, A. J. Boyd, F. H. Schuelein, *Sci. Mar.* **1992**, 56, 75.
- [213] P. W. Hummelinck, *Studies of the Fauna of other Curacao and other Caribbean Islands* **1968**, 25, 1.
- [214] H. A. F. Gohar, A. M. Eisawy, *Publ. Mar. Biol. Stn. Ghardaqa* **1960**, 11, 147.
- [215] G. Jarms, H. Tiemann, U. Bamstedt, *Marine Biology* **2002**, 141, 647.
- [216] G. Jarms, U. Bamstedt, H. Tiemann, M. B. Martinussen, J. H. Fossa, *Sarsia* **1999**, 84, 55.
- [217] B. Hasse, Dissertation thesis, Ruhr-Universität Bochum **2001**.
- [218] J. Hadzi, *Zool. Anz.* **1958**, 21 Suppl., 169.
- [219] J. Hadzi, *The Evolution of the Metazoa*, Pergamon Press, London, **1963**.
- [220] B. Werner, *Acta Salmanticensia (Ciencias)* **1971**, 36, 224.
- [221] B. Werner, *Publications of the Seto Marine Biological Laboratory* **1973**, 20, 35.
- [222] B. Werner, in *Lehrbuch der speziellen Zoologie, Band 1: Wirbellose Tiere, 2. Teil* (Ed.: H. E. Gruner), Fischer, Stuttgart, **1984**, pp. 11.
- [223] J. Ott, *Meereskunde: Eine Einführung in die Geographie und die Biologie der Ozeane*, Eugen Ulmer Verlag, Stuttgart, **1988**.
- [224] N. Loges, K. Graf, L. Nasdala, W. Tremel, *Langmuir* **2006**, 22, 3073.
- [225] E. Cherdron, H.-J. Förster, M. Haerter, I. Potencsik, Gebrüder Giulini GmbH, 6700 Ludwigshafen, Deutschland, **1969**, p. 5.
- [226] H. Akazawa, K. Nishimura, Taki Chemical Co., Ltd., Kakogawa, Japan, USA, **1978**, p. 5.
- [227] M. Boutonnet, J. Kizling, P. Stenius, G. Maire, *Colloid. Surface.* **1982**, 5, 209.
- [228] G. D. Rees, R. Evans-Gowing, S. J. Hammond, H. R. Robinson, *Langmuir*

- 1999**, 15, 1993.
- [229] X. Song, S. Sun, W. Fan, H. Yu, *J. Mater. Chem.* **2003**, 13, 1817.
- [230] I. Danielsson, B. Lindmann, *Colloid. Surface.* **1981**, 3, 391.
- [231] M. Schick, W. H. Shih, *Phys. Rev. Lett.* **1987**, 59, 1205.
- [232] G. D. Rees, B. H. Robinson, *Adv. Mater.* **1993**, 5, 608.
- [233] P. D. I. Fletcher, B. H. Robinson, F. Bermejo-Barrera, D. G. Oakenfull, J. C. Dore, D. C. Steytler, **1982**, pp. 221.
- [234] P. A. Winsor, *Trans. Faraday Soc.* **1948**, 44, 376.
- [235] A. F. Holleman, E. Wiberg, N. Wiberg, in *Lehrbuch der anorganischen Chemie*, 101 ed., Walter de Gruyter, Berlin, **1995**, pp. 1521.
- [236] E. Riedel, in *Anorganische Chemie*, Walter de Gruyter, Berlin, **2004**, pp. 826.
- [237] K.-S. Kim, D. J. Macey, J. Webb, S. Mann, *Proc. R. Soc. Lond., B* **1989**, 237, 335.
- [238] S. Mann, N. H. C. Sparks, M. M. Walker, J. L. Kirschvink, *J. Exp. Biol.* **1988**, 140, 35.
- [239] M. M. Walker, C. E. Diebel, C. V. Haugh, P. M. Pankhurst, J. C. Montgomery, C. R. Green, *Nature* **1997**, 390, 371.
- [240] R. C. Beason, J. E. Nichols, *Nature* **1984**, 309, 151.
- [241] R. C. Beason, W. J. Brennon, *Ethology* **1986**, 91, 75.
- [242] M. N. Williams, J. M. Wild, *Brain Res.* **2001**, 889, 243.
- [243] M. Hanzlik, C. Heunemann, E. Holzkamp-Rötzler, M. Winklhofer, N. Petersen, G. Fleissner, *BioMetals* **2000**, 13, 325.
- [244] R. B. Frankel, R. P. Blakemore, R. S. Wolfe, *Science* **1979**, 203, 1355.
- [245] D. L. Balkwill, D. Maratea, R. P. Blakemore, *J. Bacteriol.* **1980**, 141, 1300.
- [246] K. Grünberg, E.-C. Müller, A. Otto, R. Reszka, D. Linder, M. Kube, R. Reinhardt, D. Schüler, *Appl. Environ. Microbiol.* **2004**, 70, 1040.
- [247] D. A. Bazylinski, *ASM News* **1995**, 61, 337.
- [248] D. A. Bazylinski, R. B. Frankel, in *Environmental microbe-mineral interactions* (Ed.: D. R. Lovley), ASM Press, Washington DC, USA, **2000**, pp. 109.
- [249] A. Arakaki, J. Webb, T. Matsunaga, *J. Biol. Chem.* **2003**, 278, 8745.
- [250] M. Farina, D. M. S. Esquivel, H. G. P. Lins de Barrors, *Nature* **1990**, 343, 256.
- [251] S. Mann, N. H. C. Sparks, R. B. Frankel, D. A. Bazylinski, H. W. Jannasch, *Nature* **1990**, 343, 258.
- [252] B. R. Heywood, D. A. Bazylinski, A. J. Garratt-Reed, S. Mann, R. B. Frankel, *Naturwiss.* **1990**, 77, 536.
- [253] K. H. Schleifer, D. Schüler, S. Spring, M. Weizenegger, R. Amann, W. Ludwig, M. Koehler, *Syst. Appl. Microbiol.* **1991**, 14, 379.
- [254] D. Schüler, *Int. Microbiol.* **2002**, 5, 209.
- [255] B. Campbell, *International Labmate* **2004**, 16.

## 6. Anhang

### 6.1 Abkürzungsverzeichnis

ACC	amorphes Calciumcarbonat
ACP	amorphes Calciumphosphat
B	Feldstärke
DESY	Deutsches Elektronensynchrotron
EDX	energiedispersive Röntgenspektroskopie
ESEM	Environmental Scanning Electron Microscope
FIB	Focussed Ion Beam
GAG	Glycosaminoglycane
G	Guluronat
HAP	Hydroxylapatit
HASYLAB	Hamburger Synchrotronstrahlungslaboratorium
ICDD	International Centre for Diffraction Data
M	Mannuronat
REM	Rasterelektronenmikroskop
TEM	Transmissionselektronenmikroskop
TCP	Tricalciumphosphat
TGA	thermogravimetrische Analyse
XRD	Röntgendiffraktometrie

## 6.2 Entsorgung

In der folgenden Tabelle sind die in der Arbeit verwendeten und gesondert zu entsorgenden Materialien aufgeführt.

**Tab. 6.1:** Entsorgung der in dieser Arbeit verwendeten Substanzen

<b>Substanz</b>	<b>Entsorgung</b>
Aceton	Behälter für halogenfreie Lösungsmittel
Ethanol	Behälter für halogenfreie Lösungsmittel
Isooctan	Behälter für halogenfreie Lösungsmittel
NaAOT	Behälter für organische Feststoffe
Alginate	Behälter für organische Feststoffe

### 6.3 Publikationen

#### a) wissenschaftliche Publikationen

- 1: F. Boßelmann, M. Epple, I. Sötje, H. Tiemann, in *Handbook of biomineralization*, Vol. 1 (Ed.: E. Bäuerlein), Wiley-VCH, Weinheim, **2007**, pp. 261-272
- 2: F. Boßelmann, M. Epple, in *Metal ions in life science - Biomineralization. From nature to application*, Vol. 4 (Eds.: A. Sigel, H. Sigel, R. K. Sigel), **2008**. *in press*

#### b) Konferenzbeiträge

- 1: A. Becker, F. Boßelmann, M. Epple, W. Becker, J.C. Marxen, *Crystallisation of calcium carbonate in the presence of biological additives*, Workshop des DFG-Schwerpunktprogramms Biomineralisation (Poster), Mainz, 2004.
- 2: F. Boßelmann, Kontrollierte Kristallisation in Gegenwart von Biomolekülen (Nachahmung der Biomineralisation), 2. Xantener Gespräch zur medizinisch-biologischen Chemie, Xanten, 2004
- 3: M. Epple, A. Becker, F. Boßelmann, *Structural characterisation of biominerals and biomimetic crystallisation of calcium carbonate*, Antragskolloquium des DFG-Schwerpunktprogramms Biomineralisation (Poster), Bonn, 2005
- 4: F. Boßelmann, A. Becker, M. Epple, J. C. Marxen, *Crystallization of calcium carbonate in a constant composition double diffusion device (CCDD) compared to the ammonium carbonate diffusion method*, Gordon-Konferenz zur Biomineralisation (Poster), New London, USA, 2006
- 5: F. Boßelmann, F. Neues, Characterisation of calcium-based biominerals, Berichtskolloquium des DFG-Schwerpunktprogramms Biomineralisation, Bad Honnef, 2006
- 6: F. Boßelmann, M. Epple, H. Fabritius, P. Romano, D. Raabe, Thermoanalytische, elementaranalytische und kristallographische Analyse von mineralisierten Hummerschalen, 17. Ulm-Freiburger Kalorimetrietage, Freiberg, 2007

## 6.4 Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name: Fabienne Boßelmann  
Geburtsdatum/ -ort: 29.08.1978, Hattingen  
Familienstand: ledig  
Staatsangehörigkeit: deutsch

### Schulausbildung

08/1989 – 06/1998 Städt. Gymnasium Hattingen-Holthausen, Hattingen

### Studium

10/1998 – 07/2000 Ruhr-Universität Bochum  
Grundstudium Diplombiologie  
10/2000 – 05/2003 Universität des Saarlandes – Saarbrücken  
Hauptstudium Technische Biologie und Bionik,  
Nebenfächer Biophysik und Genetik  
01/2002 – 05/2003 Studien- und Diplomarbeit im Lehrstuhl für Pulvertechnologie von Glas und Keramik, Prof. R. Clasen  
Thema Studienarbeit Herstellung beidseitig verdichteter SiO<sub>2</sub>-Grünkörper mittels elektrophoretischer Imprägnierung  
Thema Diplomarbeit Herstellung von ZrO<sub>2</sub>-Filtern mittels elektrophoretischer Abscheidung und Imprägnierung für technisch-biologische Anwendungen  
05/2004 – 04/2007 Promotion am Institut für anorganische Chemie, Arbeitskreis Prof. M. Epple, Universität Duisburg-Essen mit dem Thema: „Charakterisierung biogener Mineralien zum Verständnis der Biomineralisation und Anwendung dieser Prinzipien auf die Kristallisation verschiedener calciumbasierter Materialien“  
30/05.-28/08/2006 Forschungsaufenthalt an der Universität Bristol, Anorganische Chemie, Prof. S. Mann

### Promotionsbegleitende Fortbildungen

SS 2005 Seminar „Einführung in das industrielle Projektmanagement“, Prof. W.-D. Griebler, Sachtleben Chemie GmbH  
10/2005 Autumn School Neutronen- und Synchrotronstrahlung  
SS 2006 Seminar „Innovationsmanagement“, Prof. W.-D. Griebler, Sachtleben Chemie GmbH

### Beruflicher Werdegang

11.08. – 09.09.1998 Tätigkeit als Elektrohilfskraft bei der Firma Krupka, Elektroanlagenbau in Bochum  
01.2002 – 05.2003 Studentische Hilfskraft im Lehrstuhl für Pulvertechnologie von Glas und Keramik  
05.2004 – 04.2007 Wissenschaftliche Assistentin im  
- Anorganisch-Chemischen Fortgeschrittenenpraktikum für Lehramtsanwärter  
- Praktikum der Analytischen Chemie für Chemieingenieure  
- Analytischen Praktikum für Bachelorstudenten Wasserchemie (MALDI-TOF)



**Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit versichere ich, die vorliegende Arbeit mit dem Titel

„Charakterisierung biogener Mineralien zum Verständnis der Biomineralisation und Anwendung dieser Prinzipien auf die Kristallisation verschiedener calciumbasierter Materialien“

selbst verfasst und keine außer den angegebenen Hilfsmitteln und Quellen verwendet zu haben.

Zudem erkläre ich, dass ich die Arbeit in dieser oder ähnlicher Form bei keiner anderen Fakultät eingereicht habe.

Essen, im März 2007

Fabienne Boßelmann

## Danksagung

Mein Dank gilt Prof. Dr. Matthias Eppe für die Möglichkeit bei ihm promovieren zu dürfen und während meiner Promotion drei Monate in Bristol, Großbritannien forschen zu können.

Des Weiteren gilt mein Dank Prof. Dr. Stephen Mann und seiner Arbeitsgruppe (Bristol) mich so herzlich für diese Zeit in der Fremde aufzunehmen.

Ebenso bedanken möchte ich mich bei Prof. Dr. Hans-Curt Flemming für die Übernahme des Korreferats und die Möglichkeit der Kooperation während der Arbeit.

Meinen weiteren Kooperationspartnern Dr. J. C. Marxen, Dr. I. Sötje, Dr. H. Tiemann (Universität Hamburg), Dr. P. Romano, Dipl. Biol. H. Fabritius, Prof. Dr. D. Raabe (MPI Düsseldorf), Dr. M. Krings (RWTH Aachen) und Prof. Dr. B. Glasmacher (Universität Hannover), Dipl. Biol. C. Lang, Prof. Dr. D. Schüler (LMU München) und Dr. J. Wingender (Universität Duisburg-Essen) danke ich für die stets gute Zusammenarbeit und Hilfe.

Verschiedene Menschen standen mir mit Rat und Tat zur Seite und haben damit diese Arbeit erst möglich gemacht. Für dies möchte ich mich bei folgenden Personen bedanken:

- Dipl.-Ing. S. Boukercha für die Einweisungen und Hilfestellungen an den Rasterelektronenmikroskopen.
- Frau K. Brauner und Frau V. Hiltenkamp für die AAS-Messungen.
- Dr. C. Bähz und Dr. C. Paulmann (Hamburg) für die Hilfe am HASYLAB.
- Prof. Dr. R. Boese für die Hilfe bei dem Versuch der Datenauswertung der Einkristalldiffraktometrie und sein stetes Interesse am Fortgang der Arbeit.
- Dr. S. Davis und Herrn J. Jones (Bristol) für die Einweisung und Hilfestellungen am Transmissionselektronenmikroskop.
- Frau B. Nota für ihre stete Hilfe bei verwaltungstechnischen Fragen und Problemen mit eigensinnigen Bildverarbeitungsprogrammen.
- Dr. W. Meyer-Zaika für die vielen hilfreichen Diskussionen, seine stets helfende Hand und seine Freundschaft.

- Frau U. Giebel für die NMR-Messungen, ihre Hilfsbereitschaft und das immer offene Ohr.
- Dr. A. Becker für die Hilfestellungen bei der Einarbeitung in das vorliegende Themengebiet.
- Dr. A. L. Costa-Lagoa für ihr offenes Interesse an der deutschen Sprache, das mir manche unerwartete Frage einbrachte.

Allen weiteren Mitgliedern des Arbeitskreises für die hilfreichen Diskussionen, Tipps und das angenehme Arbeitsklima.

Mein besonderer Dank gilt den Kollegen und Freunden, die mehr als nur für ein nettes Miteinander am Arbeitsplatz zu haben waren, immer ein offenes Ohr für kleinere oder größere Probleme hatten und mit denen ich wunderschöne Tage und Abende verbringen konnte. Als da wären M. Neumann, H. Urch, J. Schwiertz, S. Kittler, F. Neues und H. Nebel.

Ohne meine Eltern, meinem Freund Steve und meiner Freundin Julia und ihre stets offenen Arme und Ohren wäre mein bisheriger Werdegang und vor allem diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Alle die hier ungenannt bleiben, bitte ich um Nachsicht. Diese Liste erhebt keinen Anspruch auf Vollständigkeit.